



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΛΩΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΔΙΑΧΥΤΑ**  
**Β-ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΑΠΟ ΜΕΓΑΛΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

**ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Θ. ΖΑΡΑΛΗ**  
**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2012**



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



826008345187

9

77





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΛΩΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΔΙΑΧΥΤΑ  
Β-ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΑΠΟ ΜΕΓΑΛΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

**ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Θ. ΖΑΡΑΛΗ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2012**



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»



**Ημερομηνία αίτησης της κ Ζαραλή Αικατερίνης: 22-9-2006**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 596<sup>α</sup>/12-12-2006**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπουσα

Μαλάμου –Μήτση Βασιλική Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Καναβάρος Παναγιώτης Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία – Εμβρυολογία Ιατρικής Σχολής πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μπάη Μαρία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 21-3-2007**

*«Μοριακή ανάλυση κλωνικότητας σε διάχυτα β-λεμφώματα από μεγάλα κύτταρα»*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 721<sup>α</sup>/11-10-2011**

<b>Καναβάρος Παναγιώτης</b>	Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία-Εμβρυολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μαλάμου –Μήτση Βασιλική</b>	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μπάη Μαρία</b>	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Στεφάνου Δημήτριος</b>	Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μπατιστάτου Άννα</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Τσιάρα Σταυρούλα</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Καψάλη Ελένη</b>	Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 11-1-2012**

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

Μαργαρίτα Τσαφλίδου

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής



**ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Βασιλική Μαλόμου Μήτσι, Καθηγήτρια και Διευκρινιστή της Ηθολογικής Ανατομικής και Παιδαγωγική Ομάδα της Διεύθυνσης που για τη Βιβλιοθήκη της και τις υποκατασκευές ούρα μου της με τη βοήθεια της εκπαίδευσης της Εθνικής και της Διεύθυνσης μου.

Ειδικότερα ευχαριστώ τους διδάκτορες στην περιοχή Καθηγήτρια Ηθολογικής Ανατομικής και Παιδαγωγική Ομάδα Καθηγήτρια Διεύθυνσης και Ιστολογίας Εμβολογίας, για την βοήθεια και τη βοήθεια τους καθ' όλη τη διάρκεια της εκπαίδευσης μου.

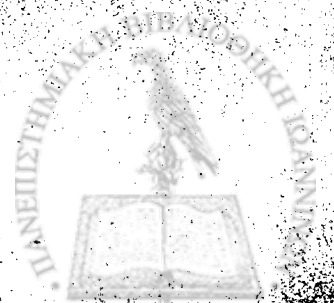
**Για τον Ίκαρο**

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κύριο Γεώργιο Βασιλικό, Καθηγητή Ηθολογικής Ανατομικής, την κυρία Ελένη Μπουτσάκου, Αναπληρώτρια Διευκρινιστή Ηθολογικής Ανατομικής, την κυρία Κωνσταντίνη Τσιόρα, Αναπληρώτρια Διεύκρινιστή Ηθολογικής Ανατομικής και την κυρία Ελένη Κουβλή, Διευκρινιστή Καθηγήτρια Αιματολογίας, οι οποίοι συνέταξαν μέλη της Επιτροπής Επιστημονικής Επιτροπής μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις ευκαταστάσεις που παρέχονται στην κυρία Άννα Ρουσσώ, Καθηγήτρια Ηθολογικής Ανατομικής, για την υποστήριξη και την βοήθεια που παρέχονται.

Ειδικότερα ευχαριστώ τον εργαζόμενο Ηθολογικής Ανατομικής για τη βοήθειά τους.

Ειδικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υπαλλήλους μου στην υπηρεσία, την κυρία Χριστίνα Παρόλη και τον κύριο Γεώργιο Σαββίδη για τη συμπαράσταση και τις συμβουλές τους. Η βοήθειά τους υπήρξε καταλυτική για την ολοκλήρωση της προεργασίας μου.



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Βασιλική Μαλάμου-Μήτση, Καθηγήτρια και Διευθύντρια της Παθολογικής Ανατομικής και επιστημονική υπεύθυνο της διατριβής μου, για τη βοήθεια της και τις εποικοδομητικές συμβουλές της κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής μου.

Ιδιαίτερα ευγνώμων είμαι απέναντι στην κυρία Μαρία Μπάη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής και στον κύριο Παναγιώτη Καναβάρο, Καθηγητή Ανατομίας και Ιστολογίας-Εμβυολογίας, για την καθοδήγηση και τη βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου πορείας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κύριο Δημήτρη Στεφάνου, Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής, την κυρία Άννα Μπατιστάτου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, την κυρία Σταυρούλα Τσιάρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας και την κυρία Ελένη Καψάλη, Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας, οι οποίοι διετέλεσαν μέλη της Επαμελούς Εξεταστικής Επιτροπής μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου απέναντι στην κυρία Άννα Γούσια, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, για την συμπαράσταση και το συνεχές ενδιαφέρον της.

Ευχαριστώ το προσωπικό του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής για τη βοήθειά τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους αγαπημένους φίλους και συνεργάτες, την κυρία Κατερίνα Βαρέλη και τον κύριο Γιάννη Σαΐνη για τη συμπαράσταση και τις συμβουλές τους. Η βοήθειά τους υπήρξε καταλυτική για την τελεσφόρηση της προσπάθειάς μου.



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα (DLBCL) ορίζεται ως ο διάχυτος πολλαπλασιασμός νεοπλασματικών Β-λεμφοκυττάρων, τα οποία έχουν εμφανή πυρήνα, φυσαλιδώδη χρωματίνη και βασεοφιλικό κυτταρόπλασμα. Το DLBCL αποτελεί τον πιο συχνά εμφανιζόμενο τύπο non-Hodgkin λεμφώματος στο Δυτικό κόσμο (25-30%), αριθμώντας 30.000 νέες περιπτώσεις κάθε χρόνο. Το DLBCL είναι ιδιαίτερα ετερογενές μορφολογικά, ανοσοφαινοτυπικά και γενετικά/μοριακά και για το λόγο αυτό αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένων μελετών.

Το DLBCL αποτελείται από Β-λεμφοκύτταρα πλήρως διαφοροποιημένα και με πλήρως ανασυνδυασμένο κυτταρικό υποδοχέα. Ο υποδοχέας των Β-λεμφοκυττάρων είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη και αποτελείται από δύο ελαφριές και δύο βαριές αλυσίδες. Η κάθε αλυσίδα κωδικοποιείται από πληθώρα V, J και C γονιδίων, ενώ η βαριά αλυσίδα κωδικοποιείται και από D γονίδια. Ο ανασυνδυασμός τυχαίων V, D, J και C γονιδίων οδηγεί στη δημιουργία ενός αντισώματος (ανοσοσφαιρίνης), εξειδικευμένου έναντι ενός συγκεκριμένου αντιγόνου.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η εξακρίβωση της ύπαρξης πιθανής μονοκλωνικότητας και η ανίχνευση των κλωνικών αναδιατάξεων της βαριάς αλυσίδας του Β-κυτταρικού υποδοχέα σε γενετικό υλικό ασθενών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, ενώ οι αναδιατάξεις που θα προκύψουν από την παρούσα μελέτη θα συγκριθούν με ήδη κατετεθειμένες αλληλουχίες. Επιπλέον, επιθυμητό αποτέλεσμα είναι η εύρεση της συνηθέστερα παρατηρούμενης κλωνικής αναδιάταξης σε περιπτώσεις DLBCL στην περιοχή της Ηπείρου.





## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

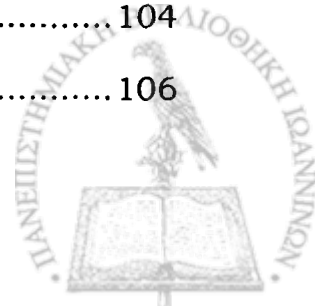
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	13
<b>1. ΔΙΑΧΥΤΟ ΛΕΜΦΩΜΑ ΑΠΟ ΜΕΓΑΛΑ Β-ΚΥΤΤΑΡΑ (Diffuse Large B Cell Lymphoma/DLBCL)</b> .....	13
<b>1.1. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ</b> .....	13
<b>1.2. ΕΝΤΟΠΙΣΗ - ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ</b> .....	14
<b>1.3. ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ</b> .....	15
<b>1.4. ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ - ΥΠΟΤΥΠΟΙ</b> .....	15
<b>1.5. ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΣΤΟ DLBCL</b> .....	19
<b>2. Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ (BCR)</b> .....	22
<b>2.1. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ - ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ</b> .....	22
<b>2.2. ΩΡΙΜΑΝΣΗ, ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ</b> .....	24
<b>2.3. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ</b> .....	33
<b>2.4. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ</b> .....	38
<b>A) Βαριά Αλυσίδα</b> .....	39
<b>B) Ελαφριά Αλυσίδα</b> .....	41
<b>2.5. ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ</b> .....	43
<b>A) Ανασυνδυασμός V(D)J</b> .....	43
<b>B) Σωματική Υπερμετάλλαξη και Ωρίμανση Συγγένειας</b> .....	47
<b>Γ) Αλλαγή Τάξεως</b> .....	48
<b>2.6. ΤΡΟΠΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ</b> .....	49
<b>2.7. ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ</b> .....	51
<b>ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	55



<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>57</b>
<b>1. ΥΛΙΚΑ .....</b>	<b>57</b>
<b>1.1. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ .....</b>	<b>57</b>
<b>1.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ.....</b>	<b>57</b>
<b>1.3. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....</b>	<b>59</b>
<b>1.4. ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΕΣ .....</b>	<b>59</b>
<b>1.5. ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ .....</b>	<b>61</b>
<b>1.6. ΠΡΟΤΥΠΑ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΒΑΡΩΝ.....</b>	<b>63</b>
<b>1.7. ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ.....</b>	<b>64</b>
<b>1.8. ΠΑΚΕΤΑ ΥΛΙΚΩΝ.....</b>	<b>65</b>
<b>2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>67</b>
<b>2.1. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA .....</b>	<b>67</b>
<b>2.2. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΦΡΕΣΚΟΥ ΙΣΤΟΥ</b>	<b>69</b>
<b>2.3. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA.....</b>	<b>70</b>
<b>2.4. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ DNA ΜΕ ΤΟ ΠΑΚΕΤΟ ΥΛΙΚΩΝ WIZARD® DNA CLEAN-UP SYSTEM .....</b>	<b>71</b>
<b>2.5. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗΣ DNA .....</b>	<b>72</b>
<b>2.6. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗΣ DNA .....</b>	<b>73</b>
<b>2.7. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ΓΙΑ ΤΟ Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ .....</b>	<b>74</b>
<b>2.8. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ.....</b>	<b>77</b>
<b>2.9. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....</b>	<b>78</b>
<b>2.10. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ .....</b>	<b>80</b>



2.11. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΟΡΙΩΝ DNA - ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΧΗΜΙΚΩΣ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	81
2.12. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗΣ ΠΕΨΗΣ .....	83
2.13. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΜΟΡΙΩΝ DNA (DNA SEQUENCING) .....	84
2.14. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ .....	85
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>89</b>
<b>1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA .....</b>	<b>89</b>
1.1. ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗΣ .....	90
1.1.1. ΤΟΜΕΣ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ ΤΩΝ 20μm ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΜΩΝ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ ΤΩΝ 10μm .....	90
1.1.2. ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΘΕΡΜΑΣΜΕΝΗΣ ΞΥΛΟΛΗΣ ΚΑΤΑ ΤΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗΣ .....	92
1.2. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΜΕ ΤΟ ΠΑΚΕΤΟ ΥΛΙΚΩΝ WIZARD® DNA CLEAN-UP SYSTEM .....	93
1.3. ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ .....	94
1.4. ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΦΡΕΣΚΟΥ ΙΣΤΟΥ .....	94
<b>2. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ .....</b>	<b>97</b>
<b>3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ (BCR) .....</b>	<b>99</b>
3.1 ΠΡΙΜΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ (PRIMERS) ΚΑΤΑ MEIER <i>et al.</i> .....	99
3.1.1 ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ Platinum® Pfx DNA Polymerase .....	100
Α) Δοκιμές με διάφορα Units της πολυμεράσης .....	100
Β) Δοκιμές παρουσία ή μη του Enhancer Solution .....	102
Γ) Δοκιμές σχετικά με τη συγκέντρωση των πριμοδοτικών μορίων .....	104
Δ) Δοκιμές σχετικά με τη συγκέντρωση των Mg <sup>2+</sup> .....	106



E) Βέλτιστες συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης	107
3.1.2 ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ Platinum® Taq DNA Polymerase .....	109
3.2 ΠΡΙΜΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ (PRIMERS) ΚΑΤΑ MISHIMA <i>et al.</i>	111
3.2.1 ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity.....	112
3.2.2 ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ Platinum® Pfx DNA Polymerase .....	113
A) Δοκιμές PCR με διαφορετικές θερμοκρασίες και αριθμούς κύκλων κατά την PCR. ....	113
B) semi-nested PCR.....	118
3.3 ΠΡΙΜΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΠΑΚΕΤΟΥ ΥΛΙΚΩΝ INVIVOSCRIBE TECHNOLOGIES.....	121
4. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ DNA ΜΕ ΤΟ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ MEGA 4 ΚΑΙ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΠΑΡΟΜΟΙΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΥ BLAST.....	124
A) Συγκριτική αντιστοίχιση μέσω του αλγορίθμου CLUSTALW των αλληλουχιών που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή.....	125
B) Εύρεση παρόμοιων αλληλουχιών μέσω του αλγόριθμου BLAST.....	129
Γ) Συγκριτική αντιστοίχιση μέσω του αλγορίθμου CLUSTALW των αλληλουχιών που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή με παρόμοιες αλληλουχίες. ....	132
Δ) Κατασκευή δενδρογραμμάτων για τις αλληλουχίες που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή με τη μέθοδο κατασκευής Neighbor-Joining . ....	136
Ε) Κατασκευή δενδρογραμμάτων για τις αλληλουχίες που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή και για παρόμοιες αλληλουχίες με τη μέθοδο κατασκευής Neighbor-Joining. ....	137



<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	141
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	147
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	149
<b>SUMMARY</b> .....	151
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	153
<b>I. ΑΡΘΡΑ</b> .....	153
<b>II. ΒΙΒΛΙΑ</b> .....	164



# 1. ΔΙΑΧΥΤΟ ΛΕΜΦΩΜΑ ΑΠΟ ΜΕΓΑΛΑ Β-ΚΥΤΤΑΡΑ (Diffuse Large B Cell Lymphoma/DLBCL)

## 1.1. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Σύμφωνα με την ταξινόμηση του Οργανισμού WHO (World Health Organization) (1), το διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα (DLBCL/ WHO-ICD-O: 9680/3) ορίζεται ως ο διάχυτος πολλαπλασιασμός νεοπλασματικών Β-λεμφοκυττάρων, τα οποία έχουν εμφανή πυρήνα, φυσαλιδώδη χρωματίνη και βασεοφιλικό κυτταρόπλασμα. Ο πυρήνας τους έχει μέγεθος μεγαλύτερο από το διπλάσιο του πυρήνα δύο μικρών λεμφοκυττάρων ή μεγαλύτερο από τον πυρήνα ενός φυσιολογικού ισιοκυττάρου. Τα νεοπλασματικά κύτταρα του λεμφώματος DLBCL μοιάζουν συνήθως με κεντροβλάστες (πολλαπλά περιφερικά τοποθετημένα πυρήνια) ή ανοσοβλάστες (ένα κεντρικά τοποθετημένο πυρήνιο) και παρουσιάζουν υψηλό κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το αντίστοιχο φυσιολογικό Β-λεμφοκύτταρο του DLBCL NOS είναι Β-λεμφοκύτταρο του βλαστικού κέντρου (germinal center) ή σταδίου διαφοροποίησης μετά το βλαστικό κέντρο (post germinal center).

Το DLBCL εμφανίζει μεγάλη μορφολογική, ανοσοφαινοτυπική και γενετική/μοριακή ετερογένεια (2-7). Για το λόγο αυτό, το DLBCL περιλαμβάνει διάφορες μορφολογικές ποικιλίες, ανοσοφαινοτυπικούς και μοριακούς υπότυπους, αλλά και ξεχωριστές ανοσολογικές οντότητες. Ωστόσο, ένας μεγάλος αριθμός περιπτώσεων DLBCL παραμένει αταξινομήτος καθώς δεν υπάρχουν αποδεκτά κριτήρια ταξινόμησής τους. Οι περιπτώσεις αυτές καλούνται διάχυτα λεμφώματα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα μη περαιτέρω



προσδιοριζόμενα (Diffuse Large B-cell Lymphomas Non Otherwise Specified/ NOS).

## 1.2. ΕΝΤΟΠΙΣΗ - ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Το διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα αποτελεί τον πιο συχνά εμφανιζόμενο τύπο non-Hodgkin λεμφώματος στο Δυτικό κόσμο (25-30%) αριθμώντας 30.000 νέα περιστατικά κάθε χρόνο, ενώ η νόσος εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στις αναπτυσσόμενες χώρες (8). Το μεγαλύτερο ποσοστό κρουσμάτων της νόσου παρατηρείται κατά την έβδομη δεκαετία στη ζωή των ασθενών.

Η νόσος πλήττει κυρίως λεμφαδένες (60% των περιπτώσεων), αλλά μπορεί να έχει και εξωλεμφαδενική εντόπιση (κυρίως στο γαστρεντερικό σύστημα, στόμαχο και ειλεοτυφλική περιοχή), αλλά κάθε εξωλεμφαδενική εντόπιση μπορεί να αποτελεί πρωτοπαθή θέση ανάπτυξης του λεμφώματος. Οι ασθενείς εμφανίζουν συνήθως διόγκωση μονήρους ή πολλαπλών λεμφαδένων ή μία ταχέως αναπτυσσόμενη ογκόμορφη αλλοίωση. Οι περισσότεροι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί ή εμφανίζουν συμπτωματολογία εξαρτώμενη από τη θέση ανάπτυξης του λεμφώματος. Στο 10%-20% των περιπτώσεων DLBCL παρατηρείται διήθηση του μυελού των οστών και στο 1/3 αυτών των περιπτώσεων ανευρίσκονται νεοπλασματικά κύτταρα στο περιφερικό αίμα.

Η πλειονότητα των ασθενών αντιδρά θετικά σε πολυπαραγοντική χημειοθεραπεία (CHOP) με ποσοστό 50-60% να εμφανίζει υποχώρηση των συμπτωμάτων, ενώ η επιπρόσθετη χορήγηση αντι-CD20 θεραπείας (rituximub / R-CHOP) έχει αυξήσει το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών.



### 1.3. ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Αν και η αιτιολογία του DLBCL παραμένει αδιευκρίνιστη στις περισσότερες περιπτώσεις, σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου φαίνεται να διαδραματίζει η εκ γενετής ή επίκτητη ανοσοανεπάρκεια (AIDS). Περιπτώσεις εμφάνισης του DLBCL σε ανοσοκατασταλμένα άτομα είναι συνηθέστερα θετικές στον ιό Epstein-Barr (EBV), σε σύγκριση με αυτές που εμφανίζονται σποραδικά.

Εκτεταμένες μελέτες σχετικά με τη μοριακή παθογένεση της νόσου, έχουν αποδείξει ότι γονιδιακές τροποποιήσεις - όπως ενίσχυση ή απαλοιφή γονιδίων, σωματικές μεταλλάξεις και διαμεταθέσεις - συνεισφέρουν στην περίπλοκη διαδικασία της παθογένεσης του DLBCL.

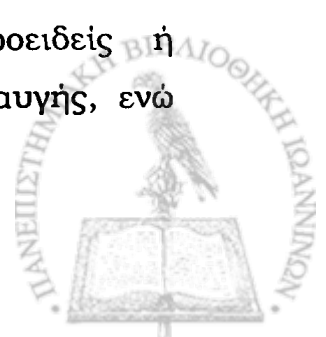
Κυτταρογενετικές και μοριακές μελέτες σε *de novo* DLBCL έχουν δείξει την επαναλαμβανόμενη παρουσία διαμεταθέσεων, κυρίως των γονιδίων *c-myc* [t(8;14)], *bcl-2* [t(14;18)(q32;q21)], *bcl-10* [t(1;14) (p22;q32)], ενώ σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζουν και οι τροποποιήσεις του γονιδίου *bcl-6* (3q27), του p53 και του πυρηνικού παράγοντα NF-kB (9).

Η νόσος εμφανίζεται συνήθως *de novo* (πρωτοπαθές DLBCL) αλλά μπορεί να αποτελεί μετάπτωση άλλων λιγότερο επιθετικών λεμφωμάτων (δευτεροπαθές λέμφωμα) όπως λεμφοζιδιακό λέμφωμα, λέμφωμα MALT, Β χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (BCLL) και άλλα.

### 1.4. ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ - ΥΠΟΤΥΠΟΙ

Σύμφωνα με την ταξινόμηση της WHO (10), υπάρχουν τρεις βασικές διακριτές μορφολογικές ποικιλίες DLBCL NOS και κάποιες σπάνια εμφανιζόμενες:

- Κεντροβλαστική ποικιλία: Η κεντροβλαστική ποικιλία αποτελείται από μεσαίου ή μεγάλου μεγέθους κεντροβλάστες με ωοειδείς ή υποστρόγγυλους πυρήνες. Η χρωματίνη των κυττάρων είναι διαυγής, ενώ





υπάρχουν και 2-4 πυρήνια προσκολλημένα στην πυρηνική μεμβράνη. Το κυτταρόπλασμα συνήθως είναι λίγο, αμφίφιλο ή βασεόφιλο. Το ποσοστό των ανοσοβλαστών σε αυτή την ποικιλία DLBCL είναι <90% των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων.

- Ανοσοβλαστική ποικιλία: Η συγκεκριμένη μορφολογική ποικιλία απαντάται συνήθως σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή. Το μεγαλύτερο ποσοστό (>90%) των νεοπλασματικών κυττάρων είναι ανοσοβλάστες με ένα κεντρικά τοποθετημένο πυρήνιο, ενώ το κυτταρόπλασμα είναι βασεόφιλο. Οι ανοσοβλάστες είναι μεσαίου προς μεγάλου μεγέθους λεμφοκύτταρα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ανοσοβλάστες εμφανίζουν πλασματοκυτταρική διαφοροποίηση.

- Αναπλαστική ποικιλία: Τα νεοπλασματικά κύτταρα στη συγκεκριμένη ποικιλία DLBCL είναι μεγάλου μεγέθους και έχουν πλειόμορφους πυρήνες. Συχνά μοιάζουν εν μέρει με κύτταρα Hodgkin ή με καρκινωμάτωση κύτταρα.

Μελετώντας τη γονιδιακή έκφραση του DLBCL, οι Alizadeh *et al.* (11) διέκριναν τη νόσο σε δύο μοριακούς υπότυπους: ABL-DLBCL και GCBL-DLBCL. Ο Rosenwald *et al.* (12) επιβεβαίωσε τα παραπάνω ευρήματα και προσέθεσε έναν τρίτο μοριακό υπότυπο, το DLBCL τύπου 3.

- DLBCL με γονιδιακή έκφραση παρόμοια με αυτή των *in vitro* ενεργοποιημένων περιφερικών Β-λεμφοκυττάρων (Activated B-cell Like / ABL-DLBCL). Στο συγκεκριμένο υπότυπο εκφράζονται γονίδια τα οποία εκφράζονται φυσιολογικά κατά την *in vitro* ενεργοποίηση Β-λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος (MUM1/LSIRF, bcl2, FLIP). Η συχνότερα εμφανιζόμενη διαμετάθεση σε αυτόν τον υπότυπο είναι η διαμετάθεση του γονιδίου bcl-6 (13).

- DLBCL με γονιδιακή έκφραση παρόμοια με αυτή των Β-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου (Germinal Center B-cell Like / GCBL-DLBCL). Σε αυτό τον υπότυπο εκφράζονται γονίδια του βλαστικού κέντρου όπως bcl6, CD10, CD38. Μία συχνά (~30%) εμφανιζόμενη διαμετάθεση στο συγκεκριμένο υπότυπο είναι η t(14;18)(q32;q21) του γονιδίου bcl-2 (14-16). Ο συγκεκριμένος υπότυπος εμφανίζει καλύτερα



ποσοστά (60%) πενταετούς επιβίωσης συγκριτικά με τον υπότυπο ABL-DLBCL (35%) και τον υπότυπο τύπου 3 (12).

- DLBCL τύπου 3, όπου καμία από τις παραπάνω δύο ομάδες γονιδίων δεν εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα (17, 18).

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες με τη συνδυασμένη έκφραση των αντιγονικών δεικτών CD5, CD10, Bcl6 και IRF4/MUM1 διαχωρίζουν το DLBCL σε τρεις ανοσοφαινοτυπικούς υπότυπους:

- Πρότυπο ανοσοϊστοχημικής έκφρασης ομοιάζον με αυτό των Β-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου (Germinal Center B-cell Like / GCBL-DLBCL). Σε αυτό τον υπότυπο εντάσσονται οι περιπτώσεις στις οποίες ο αντιγονικός δείκτης CD10 εκφράζεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 30% των νεοπλασματικών κυττάρων, καθώς και οι περιπτώσεις με ανοσοφαινότυπο CD10-, Bcl6+ και IRF4/MUM1-.

- Πρότυπο ανοσοϊστοχημικής έκφρασης ομοιάζον με αυτό των ενεργοποιημένων περιφερικών Β-λεμφοκυττάρων (Activated B-cell Like / ABL-DLBCL). Σε αυτό τον υπότυπο εντάσσονται οι περιπτώσεις που δεν ανήκουν στον προαναφερόμενο ανοσοφαινοτυπικό υπότυπο.

- CD5-θετικό διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα.

Το 2008 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) διέκρινε και πέντε νοσολογικές οντότητες διάχυτου λεμφώματος από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα:

- Λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα πλούσιο σε Τ-λεμφοκύτταρα/ιστιοκύτταρα (T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma). Ο συγκεκριμένος υπότυπος εμφανίζει επιθετική βιολογική συμπεριφορά και αποτελείται από μικρό αριθμό μεγάλων μεταμορφωμένων άτυπων Β-λεμφοκυττάρων διασκορπισμένων σε ένα πλούσιο σε Τ-λεμφοκύτταρα και ιστιοκύτταρα φλεγμονώδες υπόστρωμα. Το αντίστοιχο φυσιολογικό Β-λεμφοκύτταρο του λεμφώματος αυτού είναι ώριμο Β-λεμφοκύτταρο του βλαστικού κέντρου (germinal center).

- Πρωτοπαθές διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) (Primary DLBCL of CNS). Αποτελεί



νεοπλασία του κεντρικού νευρικού συστήματος (ενδοκρανιακό ή ενδοφθαλμικό) και εμφανίζει επιθετική βιολογική συμπεριφορά. Εξαιρούνται τα λεμφώματα της σκληρής μήνιγγας, το ενδοαγγειακό Β-λέμφωμα από μεγάλα Β-κύτταρα, λεμφώματα με συστηματική προσβολή ή δευτερογενή λεμφώματα του κεντρικού νευρικού συστήματος και λεμφώματα τα οποία σχετίζονται με ανοσοανεπάρκεια. Το αντίστοιχο φυσιολογικό Β-λεμφοκύτταρο του λεμφώματος αυτού είναι ώριμο ενεργοποιημένο Β-λεμφοκύτταρο του βλαστικού κέντρου (late germinal center).

- Πρωτοπαθές δερματικό διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα, τύπου ποδός (Primary cutaneous DLBCL, leg-type). Αποτελείται αποκλειστικά από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα (κεντροβλάστες και κεντροκύτταρα), ενώ το αντίστοιχο φυσιολογικό Β-λεμφοκύτταρο είναι ώριμο Β-λεμφοκύτταρο σταδίου διαφοροποίησης μετά το βλαστικό κέντρο (post germinal center). Εμφανίζεται στα κάτω άκρα ηλικιωμένων ατόμων και έχει επιθετική βιολογική συμπεριφορά.

- Epstein-Barr - θετικό διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα των ενηλίκων (EBV-positive DLBCL of the elderly). Αποτελείται από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα μολυσμένα από τον ιό Epstein-Barr. Το φυσιολογικό αντίστοιχο κύτταρο του συγκεκριμένου λεμφώματος είναι ώριμο Β-λεμφοκύτταρο μετασχηματισμένο από το ιό Epstein-Barr. Αναπτύσσεται συνήθως σε εξωλεμφαδενικές θέσεις και απαντάται σε άτομα άνω των 50 ετών χωρίς κάποια γνωστή ανοσοανεπάρκεια. Από το συγκεκριμένο τύπο λεμφώματος εξαιρούνται οι περιπτώσεις καλά χαρακτηριζόμενων τύπων λεμφωμάτων EBV-θετικών.

- Διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα σχετιζόμενο με χρόνια φλεγμονή (Diffuse Large B-cell Lymphoma associated with chronic inflammation). Ο συγκεκριμένος υπότυπος αποτελείται από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα και σχετίζεται αιτιοπαθογενετικά με τον ιό Epstein-Barr. Το φυσιολογικό αντίστοιχο είναι ώριμο Β-λεμφοκύτταρο σταδίου διαφοροποίησης μετά το βλαστικό κέντρο (post germinal center) μετασχηματισμένο από τον ιό Epstein-Barr. Σχετίζεται με χρόνιες φλεγμονές



και αναπτύσσεται σε κοιλότητες ή στενούς χώρους (πλευριτική κοιλότητα, οστά, αρθρώσεις) με τη μορφή ογκόμορφης αλλοίωσης.

## 1.5. ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΣΤΟ DLBCL

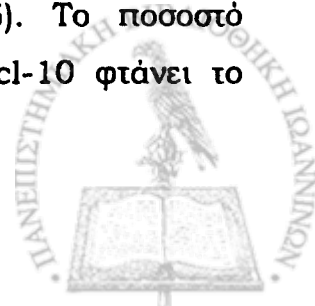
Οι συνηθέστερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες που παρατηρούνται στο διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-κύτταρα αφορούν στα ακόλουθα γονίδια:

- *c-myc*. Διαμεταθέσεις του πρωτοογκογονιδίου *c-myc* [t(8;14)] που οδηγούν σε μεταφορά του στο χρωμόσωμα 14, ακριβώς μετά από τον ενισχυτή (*enhancer*) του γονιδιακού τόπου της *IgH* και έχουν ως αποτέλεσμα την ενίσχυσή του (19), παρατηρούνται στο 10% των περιπτώσεων DLBCL παγκοσμίως και συνδυάζονται με φτωχή πρόγνωση (20). Συνύπαρξη απορυθμισμένων γονιδίων *c-myc* και *p53* έχουν σχετισθεί με επιθετική κλινική πορεία και πτωχή επιβίωση (21). Η απορύθμιση του γονιδίου *c-myc* φαίνεται να είναι ένα δεύτερο και εξίσου σημαντικό γεγονός κατά τη μετάπτωση του λεμφοζυδιακού λεμφώματος με απορυθμισμένο *bcl-2* γονίδιο, σε διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα (22, 23).
- *p53*. Η φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης P53 περιλαμβάνει α) την ενεργοποίηση γονιδίων που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA, β) την επαγωγή έκφρασης γονιδίων - όπως το γονίδιο που κωδικοποιεί την P21<sup>CIP</sup> - που αναστέλουν κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες, οδηγώντας σε παύση του κυτταρικού κύκλου και γ) την επαγωγή έκφρασης γονιδίων που οδηγούν σε απόπτωση. Απάλειψη ή μεταλλάξεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *p53* έχουν βρεθεί στο 20% των περιπτώσεων DLBCL και φαίνεται να σχετίζονται με επιθετική εξέλιξη της νόσου και φτωχή πρόγνωση (24-29).
- *bcl-2*. Η διαμετάθεση t(14;18) του γονιδίου που κωδικοποιεί την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 είναι από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες χρωμοσωμικές ανωμαλίες στο DLBCL. Το ποσοστό εμφάνισής της



πλησιάζει το 30% σε περιπτώσεις DLBCL (30, 31). Κατά τη συγκεκριμένη διαμετάθεση, το γονίδιο που κωδικοποιεί την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 μετακινείται από το χρωμόσωμα 18 στο χρωμόσωμα 14, ακριβώς μετά από τον ενισχυτή (enhancer) του γονιδιακού τόπου της IgH. Οι επιπτώσεις της ύπαρξης της συγκεκριμένης διαμετάθεσης στην εξέλιξη της νόσου έχουν γίνει αντικείμενο εκτεταμένων μελετών (16, 32-41). Κάποιες μελέτες έχουν αποδείξει το συσχετισμό της διαμετάθεσης με αυξημένες πιθανότητες υποτροπής (31), ενώ άλλες δεν έχουν καταφέρει να αποδείξουν κάποιο συσχετισμό (42-44).

- bcl-6. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες του γονιδίου που κωδικοποιεί την αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-6 παρατηρούνται στο 20-40% των πασχόντων από DLBCL (13, 42, 44-48). Η εμφάνιση της διαμετάθεσης του γονιδίου στον υπότυπο ABL-DLBCL είναι διπλάσια (24% έναντι 10%) σε σύγκριση με τον υπότυπο GCBL-DLBCL (13). Επιπλέον, στο 20% των πασχόντων από διάχυτο λέμφωμα που σχετίζεται με επίκτητη ανοσοανεπάρκεια AIDS (AIDS related DLBCL-ARL) έχουν παρατηρηθεί χρωμοσωμικές ανωμαλίες του γονιδίου bcl-6 (49). Επιπρόσθετα, στο 70% των περιπτώσεων DLBCL που εμφανίζουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες του γονιδίου bcl-6, οι σωματικές μεταλλάξεις επικεντρώνονται στο 5' άκρο του γονιδίου (50-55), ενώ το ποσοστό μειώνεται στο 58% των περιπτώσεων διάχυτου λεμφώματος που σχετίζεται με επίκτητη ανοσοανεπάρκεια AIDS (AIDS related DLBCL-ARL) (49, 56). Διαμεταθέσεις που σχετίζονται με το γονίδιο bcl-6 και λαμβάνουν χώρα εντός της περιοχής 3q27, αφορούν στην απομάκρυνση ή στη μετατροπή του εκκινήτη του γονιδίου και έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή παραγωγής της πρωτεΐνης Bcl-6 (57-62).
- bcl-10. Η αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-10 συμμετέχει στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-kappaB (NF-kB). Η διαμετάθεση t(1;14) οδηγεί σε μεταβολές του πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου bcl-10 με αποτέλεσμα την αδρανοποίησή του (63-65). Το ποσοστό εμφάνισης της διαμετάθεσης t(1;14) του γονιδίου bcl-10 φτάνει το



14,6% των περιπτώσεων DLBCL. Εμφανίζεται συχνότερα σε λεμφώματα εξωλεμφαδενικής παρά λεμφαδενικής εντόπισης (66).

- Rb-1. Το γονίδιο Rb είναι το πρώτο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που αναγνωρίστηκε. Απάλειψη ή και σημειακή ακόμα μετάλλαξη του μπορεί να οδηγήσει σε νεοπλασματική μεταλλαγή. Η πρωτεΐνη pRb διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά τον κυτταρικό κύκλο, αφού λαμβάνει μέρος στον έλεγχο της μετάβασης του κυττάρου από τη φάση G1 στη φάση S. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο Rb-1 (περιοχή 13q14) έχει αποδειχθεί να έχει υποστεί απάλειψη στο 20% των περιπτώσεων DLBCL (24, 25).
- NF-κappaB (NF-kB). Ο πυρηνικός παράγοντας NF-kB διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγραφή του DNA. Αναστολή της δράσης του οδηγεί σε διακοπή της κυτταρικής διαίρεσης και σε κυτταρικό θάνατο. Ενεργοποίηση του NF-kB φαίνεται να είναι πιο συχνή στον υπότυπο ABL-DLBCL παρά στον GCBL-DLBCL υπότυπο (67). Επίσης έχει αναφερθεί ότι σε περιπτώσεις πρωτοπαθούς λεμφώματος DLBCL του μεσοθωρακίου (θυμικού), η ενεργοποίηση του NF-kB πέραν του φυσιολογικού (upregulation) οφείλεται σε ενίσχυση του γονιδίου cREL (68), αλλά ο ρόλος του στη γένεση του λεμφώματος παραμένει ακόμα ασαφής.



## **2. Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ (BCR)**

### **2.1. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ – ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Τα Β-λεμφοκύτταρα είναι τα κύτταρα του οργανισμού που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των αντισωμάτων (ανοσοσφαιρινών) (69). Τα αντισώματα προσκολλώνται πάνω στο αντιγόνο και το σημαδεύουν για την καταστροφή του από άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Εκατομμύρια Β-λεμφοκύτταρα παράγονται σε καθημερινή βάση από τον οργανισμό. Τα Β-λεμφοκύτταρα, αποτελούν το 15% των ανοσοκυττάρων (έναντι του 65% των Τ κυττάρων και του 10% των NK (Natural Killers) κυττάρων). Τα Β-λεμφοκύτταρα προέρχονται από πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα που υπάρχουν στο μυελό των οστών (lymphoid stem cells) και στο θύλακο του Fabricius στα πτηνά. Τα βλαστικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να παράγουν τόσο λεμφοειδή βλαστικά κύτταρα (που παράγουν τα λεμφοκύτταρα) όσο και μυελοειδή βλαστικά κύτταρα (που παράγουν τους διάφορους τύπους κυττάρων του αίματος). Τα λεμφοειδή κύτταρα παράγουν τα πρόδρομα Β-λεμφοκύτταρα, τα οποία μετά από μια διαδικασία ωρίμανσης διαφοροποιούνται σε Β-κύτταρα μνήμης (memory B-cells) ή πλασματοκύτταρα (κεφάλαιο 2.2. Ωρίμανση, διαφοροποίηση και ενεργοποίηση Β-λεμφοκυττάρων).

Τα Β-λεμφοκύτταρα είτε κυκλοφορούν στο αίμα (και επομένως συγκαταλέγονται στα λευκά αιμοσφαίρια), είτε είναι εγκατεστημένα στα όργανα του λεμφικού συστήματος, όπως στους λεμφαδένες, στο σπλήνα κλπ. (70). Συγκεκριμένα, στους λεμφαδένες τα Β-λεμφοκύτταρα εγκαθίστανται στη Β-ζώνη (θυμοανεξάρτητη ζώνη) και σχηματίζουν τα πρωτογενή λεμφοζίδια (οξοειδείς αρθροίσεις ώριμων παρθένων Β-λεμφοκυττάρων). Μετά από αντιγονικό ερέθισμα, τα πρωτογενή λεμφοζίδια μετατρέπονται σε δευτερογενή, τα οποία αποτελούνται από το βλαστικό κέντρο και το μανδύα.



Τα περισσότερα λεμφοκύτταρα στο αίμα είναι μικρά (περίπου 10  $\mu\text{m}$  ή λιγότερο), αν και είναι συχνά εμφανιζόμενες και μεγαλύτερες μορφές αυτών. Ορισμένα από αυτά τα μεγάλα λεμφοκύτταρα είναι γνωστά ως μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα, διότι περιέχουν κυανόφιλα κοκκία στο κυτταρόπλασμά τους. Συχνά, η ταξινόμηση των λεμφοκυττάρων βάσει της διαμέτρου τους δεν αποκρίνεται στο συνήθη διαχωρισμό σε μικρά, μεσαία και μεγάλα λεμφοκύτταρα, λόγω του ότι οι διαστάσεις των κυττάρων ποικίλλουν ανάλογα με τη μέθοδο παρασκευής τους. Στις κηλίδες αίματος που έχουν χρωστεί με χρώση Romanovsky, ο πυρήνας είναι χρώματος βαθύ μπλε ή μωβ, συνήθως στρογγυλός στο σχήμα ή με μικρές εσοχές και αποτελείται από πυκνές συσσωρεύσεις χρωματίνης. Τα πυρήνια δεν είναι ορατά με τις συνηθισμένες τεχνικές, αν και μπορεί να εξεταστούν σε υγρές κηλίδες και ιστολογικά δείγματα. Το κυτταρόπλασμα είναι κυρίως βασεόφιλο και συνήθως στερείται κόκκων και σχηματίζει μια στενή λωρίδα στα μικρά λεμφοκύτταρα, η οποία μπορεί να είναι μεγαλύτερη στα μεγαλύτερα κύτταρα.

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τα μικρά λεμφοκύτταρα (μεγέθους 6 έως 9  $\mu\text{m}$ ) παρουσιάζουν μια ομαλή, διεπίπεδη κυτταροπλασματική μεμβράνη που περιέχει μερικές μόνο μικρολάχνες. Το ελλειπές κυτταρόπλασμα των μικρών λεμφοκυττάρων δείχνει μια αξιοσημείωτη απουσία οργανιδίων. Το σύστημα Golgi είναι μικρό και συνήθως βρίσκεται κοντά στην πυρηνική εγκοπή, ενώ δεν παρατηρείται οργανωμένο ενδοπλασματικό δίκτυο. Επίσης πολλά ελεύθερα ριβοσώματα και περιστασιακές ριβοσωμικές ομάδες είναι εμφανείς. Τα τυπικά μιτοχόνδρια είναι κοινά, αλλά τα λυσοσώματα που περιέχουν ένζυμα είναι αραιά. Ο κυτταροσκελετός αποτελείται από λίγους μικροσωληνίσκους στο κυτταρόπλασμα και μικροϊνίδια που βρίσκονται κοντά στην κυτταρική μεμβράνη. Ο πυρήνας περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη που συγχωνεύεται στα σημεία των πυρηνικών πόρων. Άφθονη πυκνή ετεροχρωματιγία σχηματίζει συσσωρεύσεις κοντά στην πυρηνική μεμβράνη και λιγότερο συχνά μέσα στο σώμα του πυρήνα. Επίσης παρατηρείται συνήθως και ένα πυρήνιο.





Ένα μέσου μεγέθους λεμφοκύτταρο είναι μεγαλύτερο (6 έως 10  $\mu\text{m}$ ), λόγω της αύξησης του ποσού του κυτταροπλάσματος. Ο πυρήνας περιέχει χρωματίνη που είναι πιο διάχυτη, κοκκιώδης και προσκολλάται μόνο εν μέρει στην πυρηνική μεμβράνη. Το σύστημα Golgi είναι περισσότερο αναπτυγμένο από ό,τι στα μικρά λεμφοκύτταρα.

## **2.2. ΩΡΙΜΑΝΣΗ, ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Κάθε Β-λεμφοκύτταρο που έχει φτάσει στο στάδιο της ωρίμανσης φέρει στην επιφάνειά του έναν κυτταρικό υποδοχέα (B cell receptor - BCR/ανοσοσφαιρίνη επιφανείας) που είναι εξειδικευμένος για τη σύνδεση με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο (71). Ο BCR-υποδοχέας/ ανοσοσφαιρίνη επιφανείας είναι μια πρωτεΐνη που διακρίνει τα Β-λεμφοκύτταρα από τα υπόλοιπα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (70).

Τα Β-λεμφοκύτταρα προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών (στελεχειαία κύτταρα - lymphoid stem cells), μετά από μια σειρά διαδοχικών σταδίων διαφοροποίησης με διακριτά μορφολογικά, γονοτυπικά και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά (Εικόνα 1). Το πρώτο στάδιο διαφοροποίησης περιλαμβάνει τα πρόδρομα Β-λεμφοκύτταρα/Β-λεμφοβλάστες (progenitor B-cells), τα οποία εξελίσσονται περαιτέρω σε προ Β-λεμφοκύτταρα (pre-B-lymphocytes). Στο στάδιο αυτό λαμβάνουν χώρα αναδιατάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν αρχικά για τη βαριά και έπειτα για την ελαφριά αλυσίδα του Β-κυτταρικού υποδοχέα [κεφάλαιο 2.5 Γονδιακός ανασυνδυασμός ανοσοσφαιρινών, Α) Ανασυνδυασμός V(D)J]. Β-λεμφοκύτταρα στα οποία δεν ολοκληρώνεται επιτυχώς ο ανασυνδυασμός των γονιδίων που κωδικοποιούν το Β-κυτταρικό υποδοχέα αποπίπτουν, ενώ επιτυχημένη αναδιάταξη των γονιδίων οδηγεί στην εμφάνιση ενός λειτουργικού μορίου IgM ανοσοσφαιρίνης στην επιφάνεια του ανώριμου Β-λεμφοκυττάρου (immature B-cell). Πρώιμη επαφή ενός ανώριμου Β-λεμφοκυττάρου με ένα αντιγόνο επηρεάζει σημαντικά την περαιτέρω



διαφοροποίησή του. Η τύχη του ανώριμου Β-λεμφοκυττάρου εξαρτάται από την ένταση των σημάτων που ο Β-κυτταρικός υποδοχέας μεταφέρει στο κύτταρο, που με τη σειρά της εξαρτάται από την πυκνότητα υποδοχέων στην επιφάνεια του κυττάρου, τη συγγένειά του με το αντιγόνο αλλά και την παρουσία άλλων αντιγόνων στη μεμβράνη του κυττάρου που λειτουργούν ως συνδιεγερτικοί υποδοχείς και ενεργοποιούν διαφορετικές ενδοκυττάρειες οδούς μεταφοράς σήματος. Αν η ένταση του σήματος είναι ισχυρή, οδηγεί σε απόπτωση του ανώριμου Β-λεμφοκυττάρου (κλωνική απάλειψη), ασθενέστερο σήμα οδηγεί σε κυτταρική «ανεργία», ενώ ακόμα ασθενέστερο ή μηδενικό σήμα οδηγεί στη δημιουργία πλήρως λειτουργικού ανώριμου Β-λεμφοκυττάρου (72).

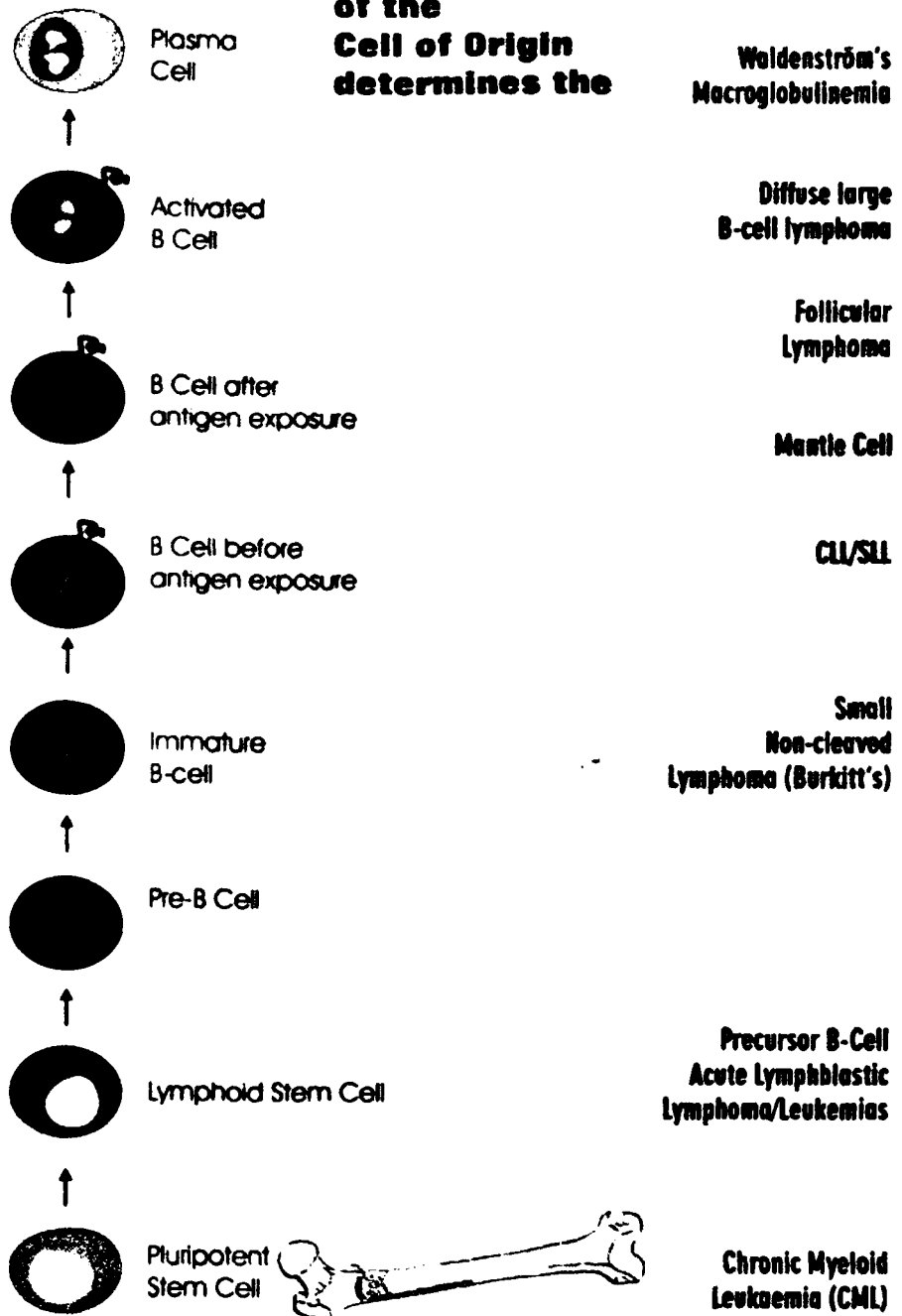
Τα ανώριμα Β-λεμφοκύτταρα που εκφράζουν επιτυχώς την IgM ανοσοσφαιρίνη, εγκαταλείπουν το μυελό των οστών και διαφοροποιούνται σε ώριμα/περιφερικά παρθένα Β-λεμφοκύτταρα (naive mature B-cells), τα οποία εκφράζουν και την IgD ανοσοσφαιρίνη στην επιφάνειά τους. Τα κύτταρα αυτά είναι μικρού μεγέθους, εκφράζουν το δείκτη CD5 και κυκλοφορούν μεταξύ περιφερικού αίματος και λεμφικών ιστών (στα πρωτογενή λεμφοζιδια και στη ζώνη του μανδύα των δευτερογενών λεμφοζιδίων), έως ότου αναγνωρίσουν μέσω του Β-κυτταρικού υποδοχέα που φέρουν, το ειδικό αντιγόνο. Αναγνώριση του αντιγόνου οδηγεί σε πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των ώριμων/περιφερικών παρθένων Β-λεμφοκυττάρων σε μεγάλα μεταμορφωμένα Β-λεμφοκύτταρα (εξωλεμφοζιδιακές Β-βλάστες/extrafollicular B-blasts). Το επόμενο στάδιο διαφοροποίησης περιλαμβάνει την εξέλιξη των εξωλεμφοζιδιακών Β-βλαστών σε μνημονικά Β-λεμφοκύτταρα προ του βλαστικού κέντρου (pre-germinal center memory B-cells) και σε βραχύβια πλασματοκύτταρα που έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν IgM ανοσοσφαιρίνες. Στο σημείο αυτό ολοκληρώνεται η πρωτογενής ανοσολογική απόκριση του οργανισμού έναντι του συγκεκριμένου αντιγόνου.

Σ



**The Maturation Stage**

**Type of Lymphoma**



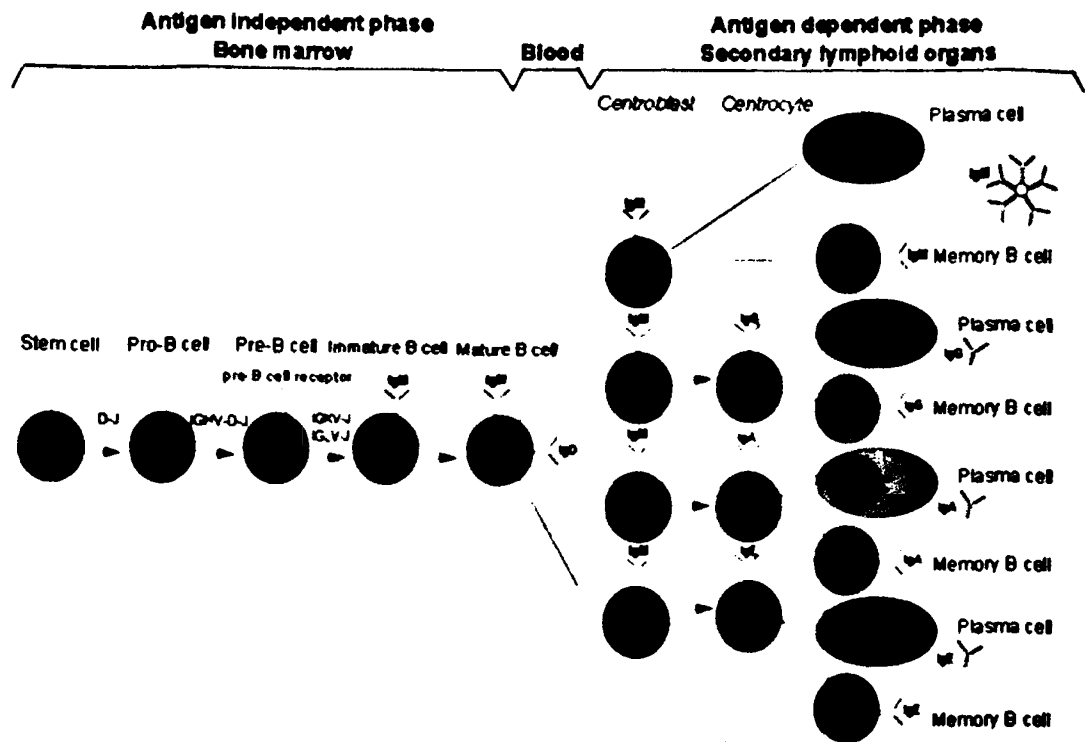
**B-cells originate in Bone Marrow ...**

*Εικ. 1: Στάδια ωρίμανσης των Β-λεμφοκυττάρων και τύποι αντίστοιχων λεμφωμάτων (ανακτημένο στις 1/12/2010 από τον ιστότοπο <http://www.lymphomation.org>)*



Επανεκθεση του οργανισμού στο ίδιο αντιγόνο πυροδοτεί τη δευτερογενή ανοσολογική απάντηση. Οι εκκρινόμενες από τα βραχύβια πλασματοκύτταρα IgM ανοσοσφαιρίνες, αναγνωρίζουν και συνδέονται στο ειδικό αντιγόνο και - σε συνεργασία με τα κύτταρα του συμπληρώματος - δημιουργούν συμπλέγματα τα οποία εγκλωβίζονται από τις αποφυάδες των δενδριτικών δικτυωτών κυττάρων του πρωτογενούς λεμφοζιδίου. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην είσοδο μερικών ευαισθητοποιημένων Β-λεμφοκυττάρων στο πρωτογενές λεμφοζίδιο και την έναρξη της αντίδρασης του βλαστικού κέντρου. Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των Β-λεμφοκυττάρων και τη μεταμόρφωσή τους σε κεντροβλάστες (centroblasts). Οι κεντροβλάστες του βλαστικού κέντρου είναι μεγάλα κύτταρα τα οποία εκφράζουν τις πρωτεΐνες CD10 και Bcl6, την IgM ανοσοσφαιρίνη επιφανείας σε χαμηλά επίπεδα, ενώ χάνουν την ικανότητα έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl2. Επιπλέον, οι κεντροβλάστες υπόκεινται σε σωματικές υπερμεταλλάξεις (somatic hypermutations/SHM) στα γονίδια των μεταβλητών περιοχών των βαρέων και των ελαφριών αλυσίδων (κεφάλαιο 2.5 Γονιδιακός ανασυνδυασμός ανοσοσφαιρινών, Β) Σωματική υπερμετάλλαξη και ωρίμανση συγγένειας). Αυτές οι υπερμεταλλάξεις είναι δυνατόν να οδηγήσουν στην παραγωγή μη λειτουργικού Β-κυτταρικού υποδοχέα/ανοσοσφαιρίνης επιφανείας ή Β-κυτταρικού υποδοχέα/ανοσοσφαιρίνη επιφανείας που να εμφανίζει χαμηλότερη ή πολύ υψηλότερη συγγένεια προς το αντιγόνο σε σύγκριση με τη συγγένεια που εμφάνιζε το παρθένο Β-λεμφοκύτταρο προς το ίδιο αντιγόνο. Οι κεντροβλάστες του βλαστικού κέντρου μπορεί να υποστούν και μεταλλάξεις του γονιδίου bcl6, αν και σε χαμηλότερη συχνότητα από τις μεταλλάξεις των γονιδίων των μεταβλητών περιοχών των ανοσοσφαιρινών. Στο βλαστικό κέντρο είναι δυνατόν ορισμένα Β-λεμφοκύτταρα να υποστούν αλλαγή τάξης (class switch) (κεφάλαιο 2.5 Γονιδιακός ανασυνδυασμός ανοσοσφαιρινών, Γ) Αλλαγή τάξεως). Η αλλαγή τάξης οδηγεί στην εμφάνιση των ανοσοσφαιρινών IgA, IgE και IgG (Εικόνα 2).





Εικ.2: Διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων (ανακτημένο στις 1/12/2010 από τον ιστότοπο <http://imgt.cines.fr>)

Επόμενο στάδιο της διαφοροποίησης των Β-λεμφοκυττάρων είναι η μεταμόρφωση των κεντροβλαστών σε κεντροκύτταρα (centrocytes), τα οποία επικρατούν στη διαυγή ζώνη του βλαστικού κέντρου. Κεντροκύτταρα τα οποία φέρουν Β-κυτταρικό υποδοχέα/ανοσοσφαιρίνη επιφανείας μη λειτουργικό ή χαμηλής ή πολύ υψηλής συγγένειας προς το αντιγόνο, αποπίπτουν μέσα στο βλαστικό κέντρο. Αντιθέτως, κεντροκύτταρα με λειτουργικό και επιθυμητής συγγένειας προς το αντιγόνο Β-κυτταρικό υποδοχέα/ανοσοσφαιρίνη επιφανείας, διαφοροποιούνται σε:

- Μνημονικά Β-λεμφοκύτταρα (Β-κύτταρα μνήμης/memory B-cells) σταδίου διαφοροποίησης μετά το βλαστικό κέντρο. Αυτά τα κύτταρα μεταναστεύουν από το βλαστικό κέντρο στην οριακή ζώνη (marginal zone) που περιβάλλει τη ζώνη του μανδύα (mantle zone) του φυσιολογικού δευτερογενούς λεμφοζιδίου. Εντοπίζονται στο περιφερικό αίμα και στην



οριακή ζώνη των λεμφοζιδίων των λεμφαδένων, του σπληνός και του λεμφικού ιστού του σχετιζόμενου με τους βλεννογόνους. Τα συγκεκριμένα λεμφοκύτταρα είναι μικρού προς μέσου μεγέθους, έχουν διαυγές κυτταρόπλασμα και εκφράζουν υψηλά επίπεδα IgM ανοσοσφαιρίνης επιφανείας. Δεν εκφράζουν τους δείκτες CD5 και CD10, ενώ η κυτταροπλασματική ανοσοσφαιρίνη IgD δεν εκφράζεται καθόλου ή εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Εκ νέου επαφή του μνημονικού B-λεμφοκυττάρου με το ειδικό αντιγόνο προκαλεί την περαιτέρω διαφοροποίησή του σε ανοσοσβλάστη, εξωλεμφοζιδιακή B-βλάστη μετά το βλαστικό κέντρο (post-germinal center extrafollicular B-blast) και τέλος σε μικρά μνημονικά B-λεμφοκύτταρα και μακρόβια πλασματοκύτταρα.

- Μακρόβια πλασματοκύτταρα. Τα συγκεκριμένα κύτταρα μεταναστεύουν από το βλαστικό κέντρο στο μυελό των οστών μέσω του περιφερικού αίματος. Έχουν τη δυνατότητα να εκφράζουν κυτταροπλασματικές ανοσοσφαιρίνες IgG ή IgA, αλλά όχι IgM ανοσοσφαιρίνες επιφανείας. Επιπλέον, εκφράζουν τους δείκτες IRF4/MUM1, CD79a, CD38 και CD138, αλλά δεν εκφράζουν το δείκτη CD20.

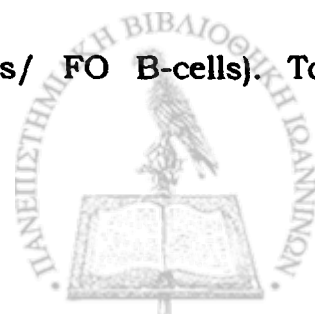
Ο συνολικός B-κυτταρικός πληθυσμός που μπορεί να παρατηρηθεί σε έναν οργανισμό είναι αρκετά ετερογενής. Συνοπτικά, η κατηγοριοποίηση των B-κυττάρων είναι η εξής:

- B-1 κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα ξεκινούν να παράγονται κατά το εμβρυικό στάδιο στα ποντίκια και τους ανθρώπους. Εκφράζουν τις ανοσοσφαιρίνες M (IgM) σε ποσότητες μεγαλύτερες από τις ανοσοσφαιρίνες G (IgG) και οι υποδοχείς τους εμφανίζουν πολλαπλή ειδικότητα, πράγμα που σημαίνει ότι έχουν χαμηλή συγγένεια για πολλά διαφορετικά αντιγόνα. Οι ανοσοσφαιρίνες αυτού του είδους έχουν συχνά μια προτίμηση για άλλες ανοσοσφαιρίνες (αυτο-αντιγόνα) και κοινούς βακτηριακούς πολυσακχαρίτες. Τα B-1 κύτταρα υπάρχουν σε μικρούς αριθμούς στους λεμφαδένες και το σπλήνα και βρίσκονται κυρίως στην περιτοναϊκή και πλευριτική κοιλότητα. Καλούνται και CD5 B-κύτταρα, καθώς εκφράζουν τον CD5 δείκτη.



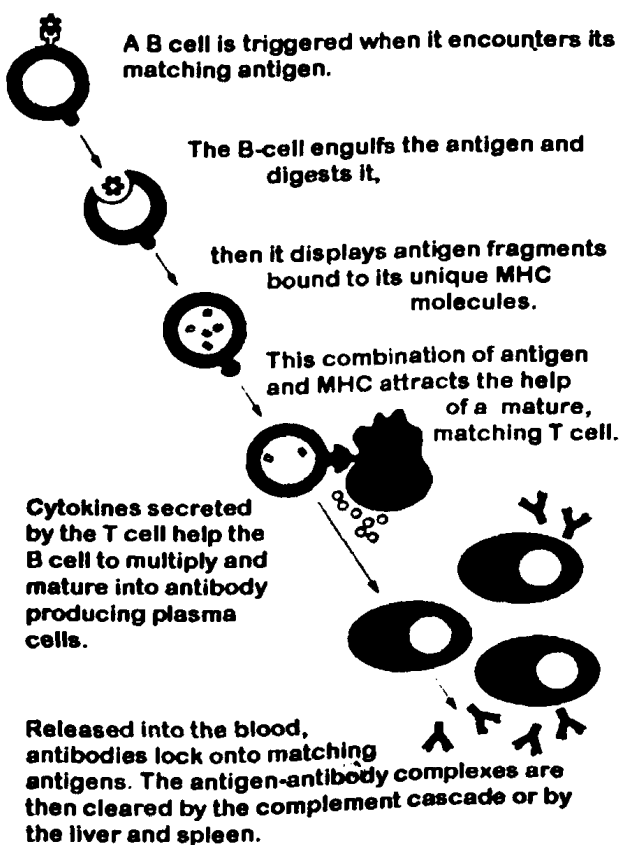
Μετά τη γέννηση, συνεχίζουν να παράγονται από το μυελό των οστών CD5 B-κύτταρα, τα οποία χρησιμοποιούν έναν περισσότερο ανομοιογενή πληθυσμό V γονιδίων για το σχηματισμό του B-κυτταρικού υποδοχέα τους. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν μία ενδιάμεση ομάδα μεταξύ των CD5 B-λεμφοκυττάρων (B-1) και των συμβατικών B-λεμφοκυττάρων (B-2) και καλούνται B-1a λεμφοκύτταρα.

- B-2 κύτταρα. Αυτά είναι τα συμβατικά B-λεμφοκύτταρα τα οποία μετά από διαδοχικά στάδια διαφοροποίησης θα οδηγήσουν στην εμφάνιση των πλασματοκυττάρων και των μνημονικών B-λεμφοκυττάρων. Πρωτοεμφανίζονται μετά τη γέννηση του οργανισμού.
- B-λεμφοκύτταρα πλάσματος (Antibody-Forming Cells/AFCs). Αυτά είναι επίσης γνωστά και ως πλασματοκύτταρα και είναι μεγάλα B-λεμφοκύτταρα που έχουν εκτεθεί σε αντιγόνο και παράγουν και εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες αντισωμάτων, τα οποία βοηθούν στην καταστροφή των μικροβίων καθώς δεσμεύονται σε αυτά, κάνοντάς τα έτσι ευκολότερους στόχους για τα φαγοκύτταρα και στην ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος. Αυτά είναι βραχύβια κύτταρα και υφίστανται απόπτωση αφότου εξουδετερωθεί ο πρωταρχικός παράγοντας που προκαλεί την ανοσολογική απόκριση.
- Μνημονικά B-λεμφοκύτταρα (Memory B-cells). Αυτά σχηματίζονται από ενεργοποιημένα B-λεμφοκύτταρα που είναι εξειδικευμένα για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο που εντοπίστηκε κατά την πρωτογενή ανοσολογική απόκριση. Αυτά τα κύτταρα είναι σε θέση να ζουν για μεγάλο χρονικό διάστημα και μπορούν να ανταποκριθούν γρήγορα μετά από επόμενη έκθεση στο ίδιο αντιγόνο.
- B-λεμφοκύτταρα οριακής ζώνης (Marginal zone B-cells). Είναι ώριμα B-λεμφοκύτταρα τα οποία ανευρίσκονται στην οριακή ζώνη του σπλήνα. Συμμετέχουν σε T-ανεξάρτητες ανοσολογικές αποκρίσεις και εκφράζουν υψηλά επίπεδα IgM, αλλά λίγο έως καθόλου το δείκτη CD5. (73, 74).
- Θυλακιώδη B-λεμφοκύτταρα (Follicular B-cells/ FO B-cells). Τα



κύτταρα αυτά αποτελούν τη δεύτερη κύρια ομάδα ώριμων Β-λεμφοκυττάρων - πέραν των Β-λεμφοκυττάρων οριακής ζώνης - που εντοπίζονται στο σπλήνα (75). Εκφράζουν υψηλά επίπεδα IgM και IgD, αλλά καθόλου το δείκτη CD5. Συμμετέχουν σε Τ-εξαρτώμενες ανοσολογικές αποκρίσεις.

Ο BCR είναι μεμβρανική ανοσοσφαιρίνη που προέρχεται από τον ανασυνδυασμό των V(D)J περιοχών των γονιδίων της βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών. Κατά την ενεργοποίηση του Β-λεμφοκυττάρου, ο BCR έχει δύο ρόλους: Πρώτον, μεταφέρει μηνύματα απ' ευθείας στο εσωτερικό του κυττάρου όταν συνδεθεί με το αντιγόνο και δεύτερον διανέμει στον ενδοκυττάριο χώρο το αντιγόνο, όπου το τελευταίο αποικοδομείται και επιστρέφει στην επιφάνεια του Β-λεμφοκυττάρου με τη μορφή πεπτιδίων συνδεδεμένων με μόρια του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (MHC), τάξης II. Το σύμπλεγμα πεπτίδιο και μόρια MHC τάξης II αναγνωρίζεται από Τ βοηθητικά κύτταρα, τα οποία είναι ειδικά για



το αντιγόνο και τα οποία ενεργοποιούνται εκκρίνοντας κυτταροκίνες, οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν τον πολλαπλασιασμό των Β-λεμφοκυττάρων και τη διαφοροποίησή τους σε κύτταρα που εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνες. Η παραγωγή ανοσοσφαιρινών αποτελεί τη δραστική λειτουργία του Β-κυττάρου και συνιστά τη χυμική ανοσία (76) (Εικόνα 3).

Εικ.3 : Ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων (ανακτημένο στις 1/12/2010 από τον ιστότοπο <http://www.lymphomation.org>)





Τα Β-λεμφοκύτταρα συνδέονται με τα αντιγόνα ακόμα και όταν βρίσκονται σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις, συγκριτικά με εκείνες που απαιτούνται για τη σύλληψή τους από άλλα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen-Presenting Cells/APCs), αφού οι μεμβρανικές ανοσοσφαιρίνες λειτουργούν ως υποδοχείς του αντιγόνου με πολύ μεγαλύτερη συγγένεια από τους ευρείας ειδικότητας υποδοχείς των άλλων κυττάρων. Η σύνδεση των αντιγόνων με τις μεμβρανικές ανοσοσφαιρίνες έχει ως αποτέλεσμα την ενδοκυττάρωση και την επεξεργασία τους από τα ειδικά Β-λεμφοκύτταρα. Στη συνέχεια τα Β-λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν τα επεξεργασμένα αντιγονικά πεπτίδια συνδεδεμένα με MHC-II μόρια, προς τα ειδικά βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα. Η αναγνώριση των αντιγονικών πεπτιδίων από τον TCR υποδοχέα οδηγεί στην ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων, επακόλουθο της οποίας είναι η επαγωγή της σύνθεσης κυτταροκινών αλλά και μεμβρανικών μορίων ικανών να συνδέονται με αντίστοιχα μεμβρανικά μόρια των Β-λεμφοκυττάρων.

Η αντιγονοπαρουσιαστική λειτουργία των Β-λεμφοκυττάρων, αν και είναι απαραίτητη για την εκδήλωση των αλληλεπιδράσεών τους με τα βοηθητικά Τ-κύτταρα, υπόκειται σε σημαντικούς περιορισμούς: Τα Β-λεμφοκύτταρα δεν ανευρίσκονται σε μεγάλο αριθμό σε όλα τα σημεία του οργανισμού, έχουν περιορισμένη φαγοκυτταρική ικανότητα και δεν είναι ικανά να επεξεργασθούν πολλά είδη αντιγόνων. Εξάλλου, στον μη προηγουμένως ευαισθητοποιημένο οργανισμό, τα ειδικά για το συγκεκριμένο αντιγόνο Β-λεμφοκύτταρα είναι εξαιρετικά σπάνια. Για το λόγο αυτό, στην πρωτογενή ανοσολογική απάντηση η επαγωγή της ενεργοποίησης των βοηθητικών Τ-κυττάρων εξαρτάται καθοριστικά από την επεξεργασία και την παρουσίαση του αντιγόνου από άλλα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, όπως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Αντίθετα, κατά τη δευτερογενή απάντηση οι ειδικοί για το αντιγόνο κλώνοι των μνημονικών Β-λεμφοκυττάρων, που έχουν δημιουργηθεί προηγουμένως, φαίνεται ότι παρουσιάζουν καλύτερη ανοσολογική απάντηση οδηγώντας σε επαρκή αντιγονοπαρουσίαση (77).



Μερικά μικροβιακά αντιγόνα μπορούν να ενεργοποιήσουν τα Β-λεμφοκύτταρα απ'ευθείας, χωρίς την παρουσία των Τ βοηθητικών κυττάρων. Η ικανότητα αυτή των Β κυττάρων να αποκρίνονται άμεσα σε αυτά τα αντιγόνα παρέχει μια γρήγορη απάντηση σε πολλά σημαντικά παθογόνα βακτήρια (76).

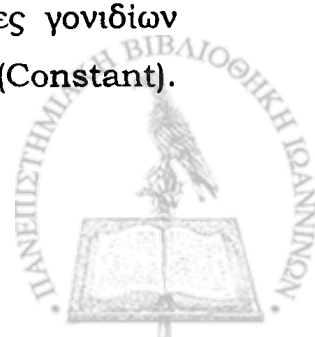
### 2.3. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Το μόριο της ανοσοσφαιρίνης είναι τετρααλυσιδικό και αποτελείται από δύο βαριές (Heavy/H/IgH) και δύο ελαφριές (Light/L/IgL) αλυσίδες που συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς (θειογέφυρες), δίνοντας στο μόριο μορφή Υ (Εικόνα 4).

- Κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης μπορεί να διακριθεί σε δύο περιοχές βάση του λειτουργικού της ρόλου: μία περιοχή είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση με το αντιγόνο, ενώ μια άλλη περιοχή είναι υπεύθυνη για τις εκτελεστικές λειτουργίες (σύνδεση με τα κύτταρα των ιστών ή με άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ενεργοποίηση του συμπληρώματος). Με την επίδραση της πρωτεάσης παπαΐνη, το μόριο της ανοσοσφαιρίνης διασπάται σε τρία θραύσματα: δύο πανομοιότυπα θραύσματα Fab (Fragment Antigen Binding) που περιέχουν τις αντιγονοδεσμευτικές περιοχές του μορίου και ένα θραύσμα Fc (Fragment Crystallizable), το οποίο περιέχει την περιοχή της ανοσοσφαιρίνης που είναι υπεύθυνη για τις εκτελεστικές λειτουργίες. Το ένζυμο πεψίνη διασπά το μόριο της ανοσοσφαιρίνης σε δύο θραύσματα: το F(ab)<sub>2</sub> που περιέχει τα δύο Fab θραύσματα - τα οποία φέρουν από μία θέση δέσμευσης του αντιγόνου - ενωμένα στον αρμό και το θραύσμα pFc' το οποίο περιέχει μέρος του θραύσματος Fc.

Όσον αφορά στην βαριά και την ελαφριά αλυσίδα των ανοσοσφαιρινών:

1. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τη βαριά αλυσίδα των ανοσοσφαιρινών εδράζονται στο χρωμόσωμα 14 και είναι οργανωμένα σε ομάδες γονιδίων (clusters), τις V<sub>H</sub> (Variable), D (Diversity), J<sub>H</sub> (Joining) και C<sub>H</sub> (Constant).



Συνολικά υπάρχουν περισσότερα από 100  $V_H$  γονίδια τα οποία χωρίζονται σε επτά οικογένειες, περίπου 30 D γονίδια, 9  $J_H$  και 11  $C_H$ .

Οι βαριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών (IgH) με βάση τις δομικές τους διαφορές διακρίνονται σε πέντε διαφορετικούς τύπους ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  ή  $\mu$ ). Με τον τρόπο αυτό οι ανοσοσφαιρίνες ταξινομούνται σε πέντε διακριτές οικογένειες ή τάξεις (ισότυποι). Οι διάφορες τάξεις των ανοσοσφαιρινών παρουσιάζουν διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες και κατανέμονται σε διαφορετικές περιοχές του οργανισμού. Οι οικογένειες αυτές έχουν ως εξής (78-80):

- IgA: Έχει διμερή μορφή και λειτουργεί ως πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού ενάντια σε βακτηριακά και ιικά αντιγόνα, δηλαδή είναι η κύρια ανοσοσφαιρίνη σε όλες τις εξωτερικές εκκρίσεις (δάκρυα, σιελος, βλέννη). Αποτελεί το 15-20% των ανοσοσφαιρινών σε ένα φυσιολογικό άτομο. Είναι γνωστό ότι υπάρχουν δύο υπο-οικογένειες /υποτάξεις IgA, η IgA1 και η IgA2.

- IgG: Υφίσταται ως μονομερές και είναι η πιο κοινή οικογένεια ανοσοσφαιρινών (70-75%). Συμμετέχει στη μακροχρόνια ανοσία μέσω των Β-λεμφοκυττάρων μνήμης και μπορεί να ενεργοποιήσει τον καταρράκτη των ενζύμων του συμπληρώματος. Η IgG μπορεί να διαπεράσει αγγειακά τοιχώματα και με τον τρόπο αυτό μητρικής προέλευσης IgG παρέχει ανοσία στα νεογέννητα κατά τους πρώτους μήνες ζωής. Αντιγόνα τα οποία δεσμεύονται από την IgG εξουδετερώνονται μέσω φαγοκυττάρωσης. Οι υπο-οικογένειες της IgG (IgG1, IgG2, IgG3 και IgG4) διαφέρουν στο βαθμό της τμηματικής ευκαμψίας.

- IgD: Αποτελεί λιγότερο από 1% των ολικών ανοσοσφαιρινών του πλάσματος. Η συμμετοχή της IgD στις ανοσολογικές αντιδράσεις δεν είναι ακόμη γνωστή, αλλά ίσως να συμμετέχει στη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων που προκαλείται μετά από έκθεση σε αντιγόνο.

- IgE: Το μονομερές μόριο της IgE έχει μικρό χρόνο ημιζωής και συναντάται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στον οργανισμό. Η IgE προσφέρει προστασία ενάντια σε παράσιτα αλλά θεωρείται υπεύθυνη και για πολλές αλλεργικές αντιδράσεις στον άνθρωπο (π.χ. άσθμα). Η ανοσοσφαιρίνη IgE έχει υποδοχείς για τη σύνδεση με τη μεμβράνη των βασεόφιλων λευκοκυττάρων και των μαστοκυττάρων (ή σιτευτικών κυττάρων). Τα κύτταρα



αυτά έχουν την ικανότητα έκκρισης ισταμίνης, μόλις η ανοσοσφαιρίνη συνδεθεί με το αντίστοιχο αντιγόνο. Οι ποσότητες της ανοσοσφαιρίνης IgE είναι αυξημένες σε άτομα σε ατοπικά νοσήματα, δηλαδή σε νοσήματα αλλεργικής αιτιολογίας. Στις περιπτώσεις αυτές τα συμπτώματα οφείλονται στην ανεξέλεγκτη παραγωγή και έκκριση ισταμίνης.

- IgM: Παράγεται ακόμα και από ανώριμα Β-λεμφοκύτταρα και από αυτήν προέρχονται όλες οι άλλες οικογένειες ανοσοσφαιρινών μέσω αλλαγής τάξης. Η IgM υφίσταται ως πενταμερές και είναι η πρώτη οικογένεια ανοσοσφαιρινών που εμφανίζεται στον οργανισμό μετά από έκθεση σε αντιγόνο. Αποτελεί το 10% περίπου των ανοσοσφαιρινών στον άνθρωπο.

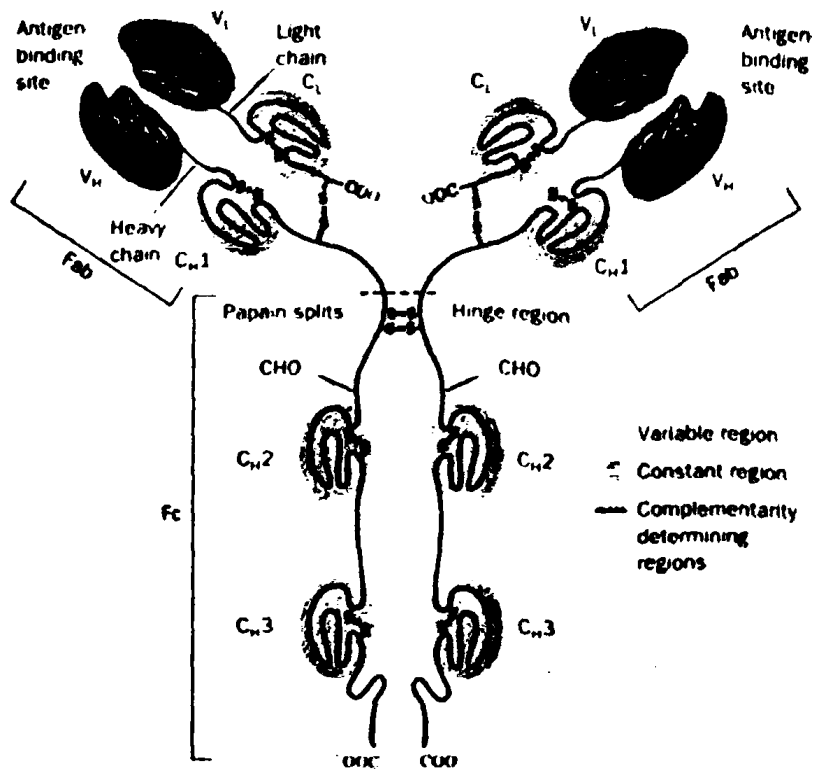
Ο ισότυπος αντισώματος ενός Β-κυττάρου αλλάζει κατά την ανάπτυξη των κυττάρων και την ενεργοποίηση. Τα ανώριμα Β-λεμφοκύτταρα, τα οποία δεν έχουν εκτεθεί ποτέ σε ένα αντιγόνο, εκφράζουν μόνο τα IgM ισότυπα σε μια επιφάνεια των κυττάρων με δεσμευμένη μορφή. Τα Β-λεμφοκύτταρα αρχίζουν να εκφράζουν τόσο την IgM όσο και την IgD όταν ωριμάσουν και η συνέκφραση και των δύο αυτών ισότυπων ανοσοσφαιρινών καθιστά το Β-λεμφοκύτταρο ώριμο και έτοιμο να απαντήσει στο αντιγόνο (ώριμο/περιφερικό παρθένο Β-λεμφοκύτταρο). Την ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων ακολουθεί η εμπλοκή του αντισώματος που είναι συνδεδεμένο με το κύτταρο με ένα αντιγόνο, που προκαλεί το κύτταρο να διαιρεθεί και να διαφοροποιηθεί σε ένα κύτταρο που παράγει αντισώματα που ονομάζεται πλασματοκύτταρο. Σε αυτήν την ενεργοποιημένη μορφή, το Β-λεμφοκύτταρο αρχίζει να παράγει αντισώματα σε μια εκκρινόμενη μορφή και όχι σε μια μορφή δεσμευμένη στη μεμβράνη. Ορισμένα θυγατρικά κύτταρα των ενεργοποιημένων Β-λεμφοκυττάρων υφίστανται μεταγωγή ισότυπου (αλλαγή τάξης), ένα μηχανισμό που προκαλεί την παραγωγή αντισωμάτων για την αλλαγή από IgM ή IgD σε αντίσωμα άλλου ισότυπου, IgE, IgA ή IgG, που να έχει καθορισμένους ρόλους στο ανοσοποιητικό σύστημα.



2. Οι ελαφριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών (IgL) με βάση τις δομικές τους διαφορές διακρίνονται σε δύο τύπους τις κάπα ( $\kappa$ ) και τις λάμδα ( $\lambda$ ) αλυσίδες, ενώ δεν έχουν παρατηρηθεί διαφορές στις βιολογικές τους δραστηριότητες. Ένα μόριο ανοσοσφαιρίνης μπορεί να έχει μόνο  $\kappa$  ή μόνο  $\lambda$  ελαφριές αλυσίδες. Οι  $\kappa$  αλυσίδες είναι περισσότερες των  $\lambda$  (ποσοστό 60% και 40%, αντίστοιχα). Τα γονίδια που κωδικοποιούν την ελαφριά αλυσίδα των ανοσοσφαιρινών εδράζονται στο χρωμόσωμα 2 για την  $\kappa$  αλυσίδα και στο χρωμόσωμα 22 για τη  $\lambda$ . Είναι οργανωμένα σε ομάδες γονιδίων, τις  $V_L$ ,  $J_L$  και  $C_L$ . Υπάρχουν 50-100  $V_\kappa$  γονίδια τα οποία χωρίζονται σε τέσσερις οικογένειες, πέντε  $J_\kappa$  γονίδια και ένα  $C_\kappa$ , ενώ τη  $\lambda$  ελαφριά αλυσίδα κωδικοποιούν περίπου 70  $V_\lambda$  γονίδια, 7-11 γονίδια  $J_\lambda$  και 7-11  $C_\lambda$  γονίδια.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι λόγω της πολυπλοκότητας στην οργάνωση του γενετικού τόπου (το σύνολο των γονιδιακών τμημάτων ή της περιοχής ενός γονιδίου ή μιας αλληλουχίας DNA σε ένα χρωμόσωμα) των ανοσοσφαιρινών, με τον όρο "γονίδιο", εννοούμε την αλληλουχία εκείνη του DNA που κωδικοποιεί ένα συγκεκριμένο τμήμα του τελικού πολυπεπτιδίου που αποτελεί είτε τη βαριά είτε την ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης.





Εικ.4: Δομή ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης (ανακτημένο στις 9/12/2010 από τον ιστότοπο <http://www.bio.cmu.edu>)

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο σχετικά με τη διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων, τα Β-λεμφοκύτταρα έχουν την ικανότητα να εκφράζουν επιφανειακές ανοσοσφαιρίνες/ Β-κυτταρικούς υποδοχείς ή να εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνες/αντισώματα στο περιβάλλον. Δηλαδή, οι ανοσοσφαιρίνες μπορεί να είναι είτε επιφανειακές (Β-κυτταρικός υποδοχέας) είτε εκκρινόμενες. Και στις δύο μορφές έχουν ακριβώς την ίδια δομή, μόνο που η επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη έχει μία επιπλέον διαμεμβρανική περιοχή στο C' άκρο (καρβοξυ-τελικό άκρο) που αποτελείται από 26 αμινοξέα. Το C' άκρο κάθε αλυσίδας μιας ανοσοσφαιρίνης είναι σταθερό, ενώ το N' άκρο (αμινο-τελικό άκρο) είναι μεταβλητό (περιοχή δέσμευσης με αντιγόνο). Η επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη (Ig) επισυνάπτεται στη μεμβράνη των Β-λεμφοκυττάρων μέσω της διαμεμβρανικής περιοχής της, ενώ τα αντισώματα είναι η εκκρινόμενη μορφή της Ig και δεν εμφανίζουν την περιοχή πέρα από τη μεμβράνη, έτσι ώστε τα αντισώματα μπορούν να εκκρίνονται στο αίμα και



στις κοιλότητες του σώματος. Ως εκ τούτου, διακρίνονται δύο μορφές αντισωμάτων: η διαλυτή μορφή και η μορφή η δεσμευμένη με τη μεμβράνη.

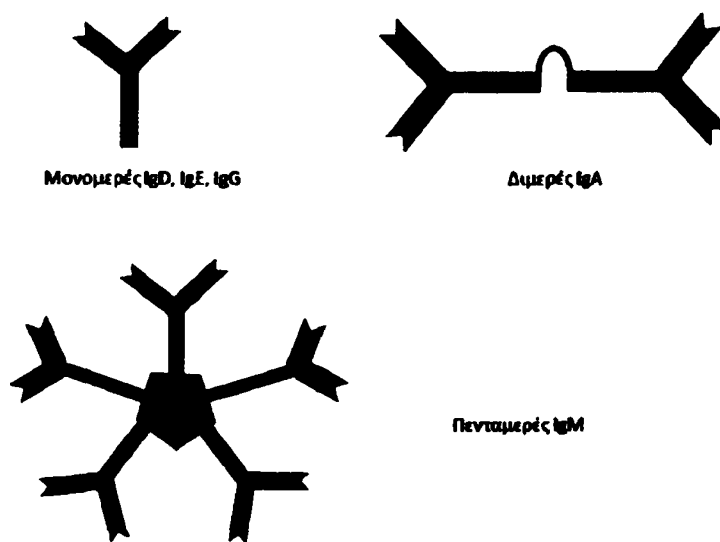
Αναγνώριση ενός αντιγόνου από την επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη/B-κυτταρικό υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του B-λεμφοκυττάρου και την έναρξη της διαφοροποίησής του που οδηγεί στην παραγωγή πλάσμακυττάρων και μνημονικών B-λεμφοκυττάρων. Οι εκκρινόμενες ανοσοσφαιρίνες/αντισώματα έχουν την ικανότητα, καθώς κυκλοφορούν στο αίμα και τις σωματικές κοιλότητες, να συνδέονται με κυκλοφορούντα αντιγόνα, με αποτέλεσμα την καταστροφή των τελευταίων (μέσω φαγοκυττάρωσης, οψωνινοποίησης κλπ) ή την αποτροπή σύνδεσής τους με άλλους κυτταρικούς υποδοχείς.

## 2.4. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Οι ανοσοσφαιρίνες είναι βαριές (~ 150 kDa) σφαιρικές πρωτεΐνες του πλάσματος και διαθέτουν μία βασική δομική μονάδα αποτελούμενη από δύο βαριές και δύο ελαφριές αλυσίδες (τετρα-αλυσιδικό μόριο Ig μονομερούς τύπου).

Τα εκκρινόμενα αντισώματα μπορούν επίσης να είναι διμερή μόρια με δύο Ig μονάδες όπως οι ανοσοσφαιρίνες IgA, τετραμερή μόρια με τέσσερις Ig μονάδες όπως οι ανοσοσφαιρίνες IgM των ψαριών, ή πενταμερή μόρια

με πέντε Ig μονάδες, όπως οι ανοσοσφαιρίνες IgM των θηλαστικών (78) (Εικόνα 5).



Εικ.5: Οικογένειες ανοσοσφαιρινών

Τα μεταβλητά τμήματα ενός αντισώματος είναι οι V περιοχές του και τα σταθερά τμήματά του είναι οι C περιοχές του. Η μονομερής Ig είναι ένα μόριο σε σχήμα "Y" που αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Δύο πανομοιότυπες βαριές αλυσίδες και δύο πανομοιότυπες ελαφριές αλυσίδες συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς (81).

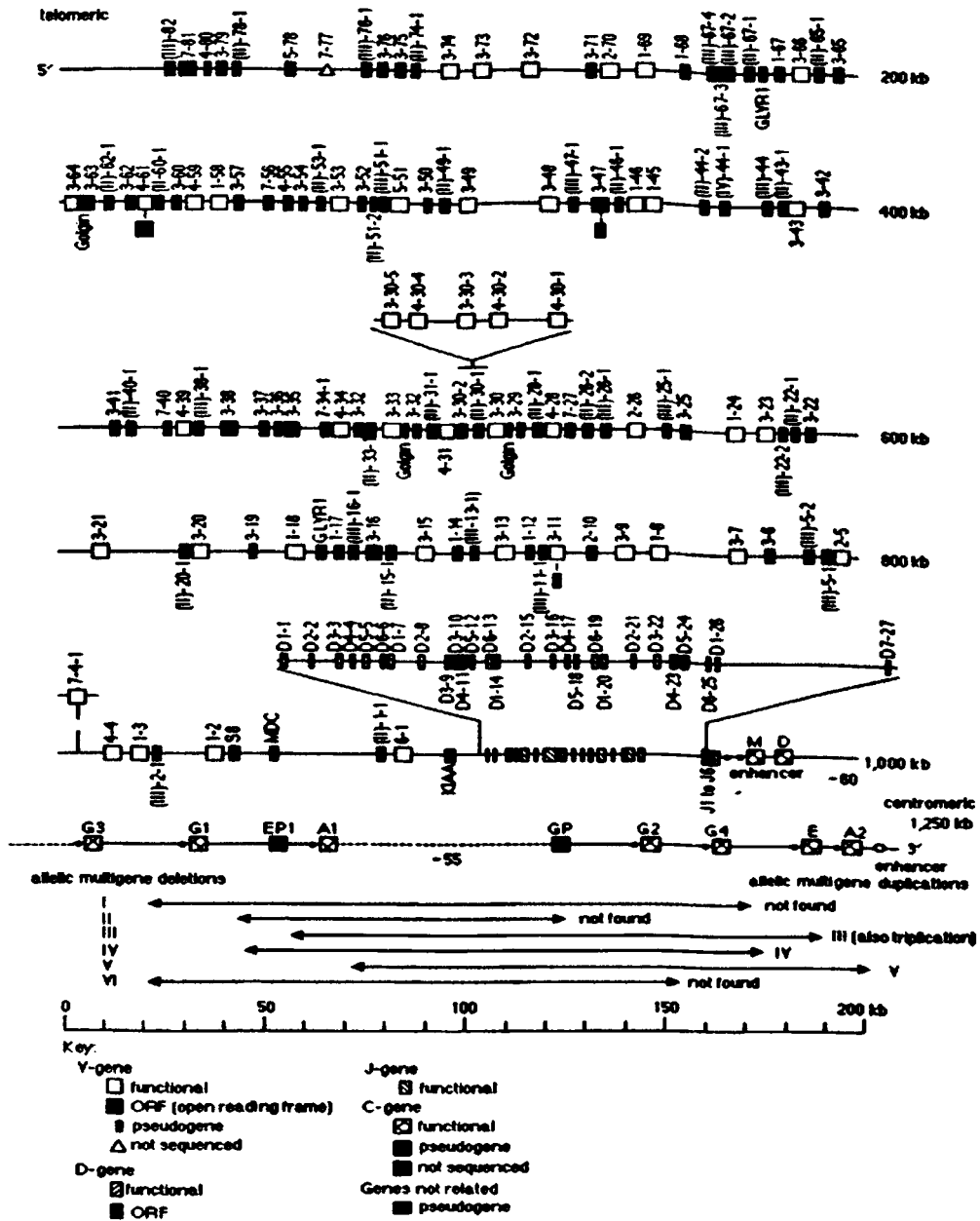
### **A) Βαριά Αλυσίδα**

Στα θηλαστικά, υπάρχουν πέντε είδη βαριάς αλυσίδας Ig που δηλώνεται με τα ελληνικά γράμματα: α, δ, ε, γ, και μ. Ο τύπος των βαρέων αλυσίδων ορίζει την κατηγορία του αντισώματος. Αυτές οι αλυσίδες βρίσκονται αντίστοιχα στα αντισώματα IgA, IgD, IgE, IgG και IgM. Οι διάφορες βαριές αλυσίδες διαφέρουν σε μέγεθος και σύνθεση. Οι α και γ περιέχουν περίπου 450 αμινοξέα, ενώ οι μ και ε έχουν περίπου 550 αμινοξέα.

Κάθε βαριά αλυσίδα έχει δύο περιοχές: τη σταθερή και τη μεταβλητή. Η σταθερή περιοχή είναι ίδια σε όλα τα αντισώματα του ίδιου ισότυπου, αλλά διαφέρει από τα αντισώματα των διαφόρων ισότυπων. Όσον αφορά στη γονιδιακή δομή, υπάρχουν περισσότερα από 100  $V_H$  γονίδια τα οποία ακολουθούν ένα αρχικό εξόνιο και ένα ενδιάμεσο ιντρόνιο. Ακολουθούν 30  $D_H$  και 9  $J_H$  γονίδια και έπονται τα 11  $C_H$  γονίδια (Εικόνα 6).





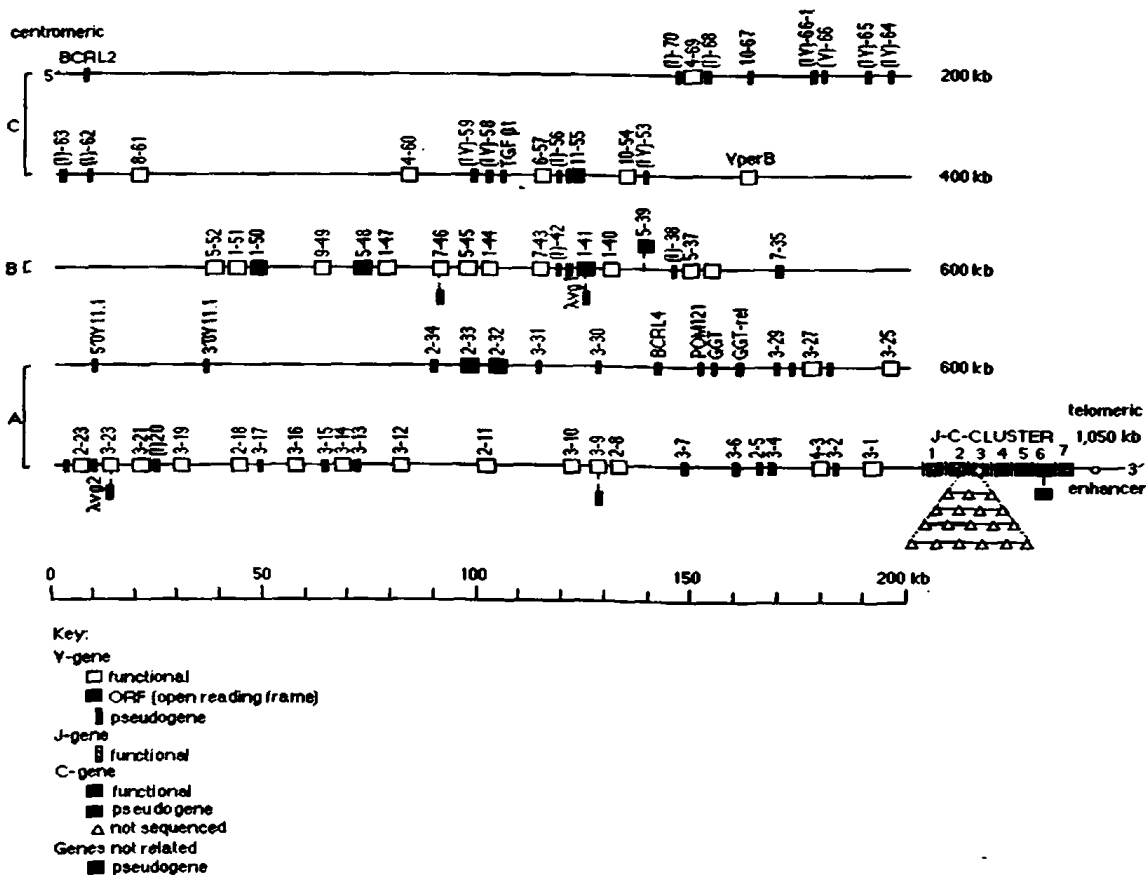


## B) Ελαφριά Αλυσίδα

Στα θηλαστικά, υπάρχουν δύο τύποι ελαφριάς αλυσίδας ανοσοσφαιρίνης, οι οποίες καλούνται λάμδα ( $\lambda$ ) και κάππα ( $\kappa$ ). Μια ελαφριά αλυσίδα έχει δύο διαδοχικούς τομείς, έναν σταθερό τομέα και έναν μεταβλητό τομέα. Το κατά προσέγγιση μήκος της ελαφριάς αλυσίδας είναι 211 με 217 αμινοξέα. Κάθε αντίσωμα περιέχει δύο ελαφριές αλυσίδες που είναι πάντοτε οι ίδιες. Μόνο ένα είδος ελαφριάς αλυσίδας,  $\kappa$  ή  $\lambda$ , είναι παρούσα ανά αντίσωμα.

Η γονιδιακή δομή των ελαφριών αλυσίδων έχει ως εξής:

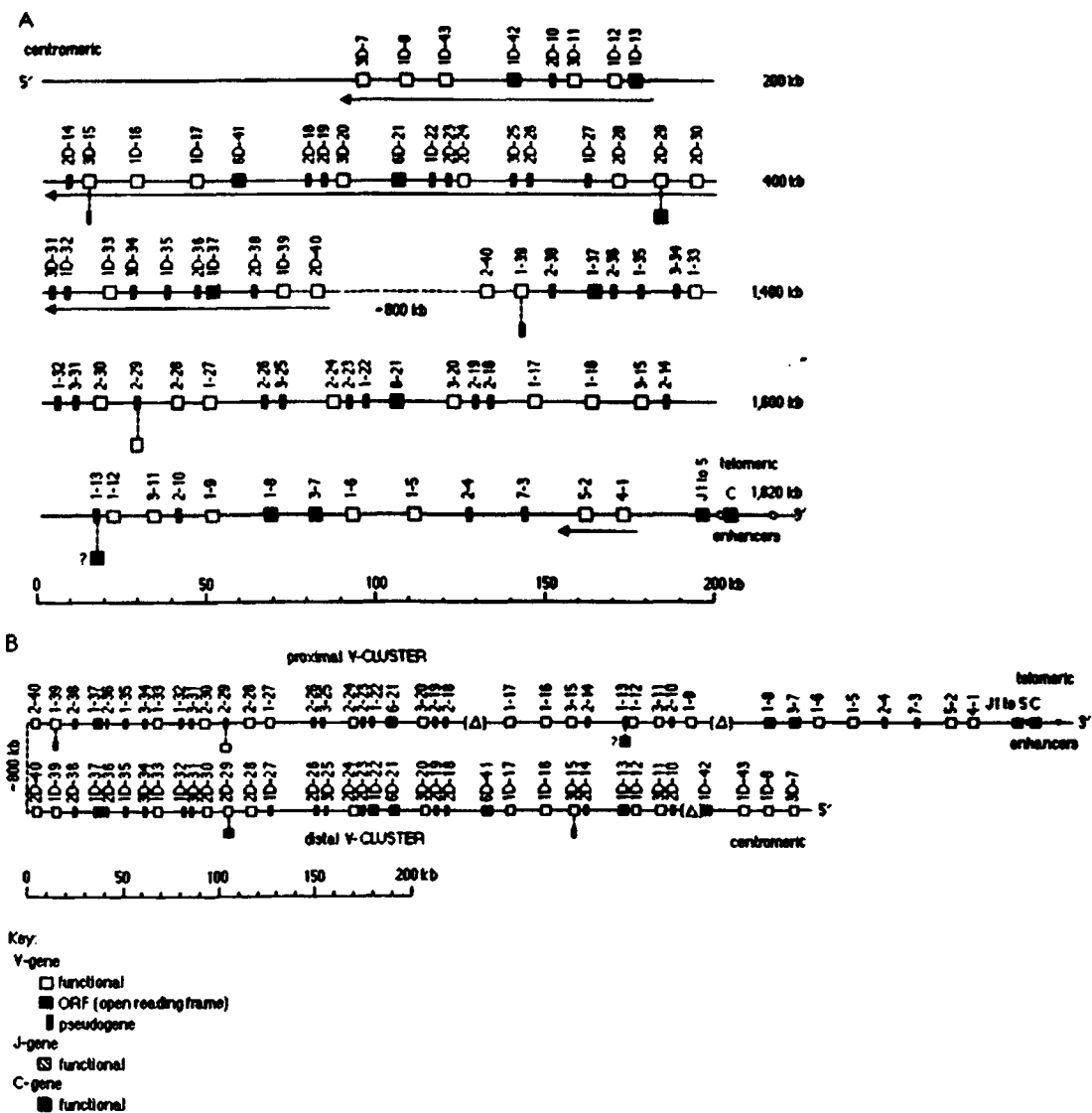
- Ελαφριά αλυσίδα  $\lambda$ : Η ομάδα των 70  $V_{\lambda}$  γονιδίων έπεται ενός αρχικού εξονίου και ενός ενδιάμεσου ιντρονίου. Ακολουθεί η περιοχή των 7-11  $J_{\lambda}$  και  $C_{\lambda}$  γονιδίων τα οποία διαχωρίζονται από ένα ιντρόνιο (Εικόνα 7).



Εικ. 7: Γονιδιακός τόπος της  $\lambda$  ελαφριάς αλυσίδας (ανακτημένο στις 9/12/2010 από τον ιστότοπο <http://www.currentprotocols.com>)



• Ελαφριά αλυσίδα κ: Ο γονιδιακός τόπος των V γονιδίων της κ ελαφριάς αλυσίδας αποτελείται από δύο τμήματα. Η οργάνωση του πρώτου V<sub>κ</sub> γονιδιακού τόπου είναι όμοια με αυτήν για τη λ ελαφριά αλυσίδα και περιλαμβάνει 36 V<sub>κ</sub> γονίδια. Ακολουθεί ο δεύτερος γονιδιακός τόπος, ο οποίος περιλαμβάνει άλλα 40 περίπου V<sub>κ</sub> γονίδια, καθώς και τα 5 J<sub>κ</sub> γονίδια τα οποία διαχωρίζονται από το μοναδικό C<sub>κ</sub> γονίδιο μέσω ενός ιντρονίου (Εικόνα 8).



Εικ. 8: Γονιδιακός τόπος της κ ελαφριάς αλυσίδας (ανακτημένο στις 9/12/2010 από τον ιστότοπο <http://www.currentprotocols.com>)



## 2.5. ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Σε κάθε Β-λεμφοκύτταρο, αρχικά γίνεται αναδιάταξη ενός μοναδικού αλληλομόρφου του γονιδίου που κωδικοποιεί τη βαριά αλυσίδα των αντισωμάτων και ενός μοναδικού αλληλομόρφου του γονιδίου που κωδικοποιεί την ελαφριά αλυσίδα των αντισωμάτων (λ ή κ αλυσίδα) (82). Εάν αυτή η αναδιάταξη είναι επιτυχής και παράγει λειτουργικές βαριές και ελαφριές αλυσίδες, δεν επιχειρείται περαιτέρω αναδιάταξη. Έτσι, κάθε ώριμο Β-λεμφοκύτταρο παράγει αντισώματα με μια συγκεκριμένη ειδικότητα.  $10^5$  μόρια αυτού του αντισώματος εμφανίζονται πάνω στη μεμβράνη των Β-λεμφοκυττάρων (82). Η ικανότητα των ώριμων Β-λεμφοκυττάρων να αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο αντιγόνο είναι προκαθορισμένη και καθορίζεται από το αρχικό ειδικό αντιγόνο το οποίο ήρθε σε επαφή με το ώριμο/περιφερικό παρθένο Β-λεμφοκύτταρο, πυροδοτώντας την περαιτέρω διαφοροποίησή του. Η τυχαία αναδιάταξη των γονιδίων του αντισώματος δημιουργεί μια τεράστια ποικιλία, ενώ ο πληθυσμός των Β-λεμφοκυττάρων στον ανθρώπινο οργανισμό εκτιμάται ότι αντιπροσωπεύει πάνω από  $10^9$  διαφορετικές αντιγονικές ιδιαιτερότητες, δηλαδή το ανοσολογικό σύστημα μέσω των Β-λεμφοκυττάρων έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει πάνω από  $10^9$  διαφορετικούς αντιγονικούς επιτόπους.

### A) Ανασυνδυασμός V(D)J

Ο σωματικός ανασυνδυασμός των ανοσοσφαιρινών, γνωστός και ως ανασυνδυασμός V(D)J, περιλαμβάνει τη δημιουργία μιας μοναδικής μεταβλητής περιοχής ανοσοσφαιρίνης. Η μεταβλητή περιοχή της κάθε βαριάς ή ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης κωδικοποιείται από πολλά τμήματα γονιδίων, γνωστά ως γονιδιακός τόπος. Τα τμήματα αυτά ονομάζονται μεταβλητά (Variable), ποικιλόμορφα (Diversity) και ενωμένα (Joining) τμήματα (83). Τα V, D και J τμήματα κωδικοποιούν τις Ig βαριές αλυσίδες, αλλά οι Ig ελαφριές αλυσίδες κωδικοποιούνται μόνο από V και J



γονιδιακά τμήματα. Υπάρχουν πολλά αντίγραφα των γονιδιακών τμημάτων V, D και J και είναι διαδοχικά διατεταγμένα στο γονιδίωμα των θηλαστικών. Στο μυελό των οστών, κάθε αναπτυσσόμενο B-λεμφοκύτταρο θα εκφράσει μια ανοσοσφαιρίνη μεταβλητής περιοχής επιλέγοντας τυχαία και συνδυάζοντας ένα V, ένα D και ένα J τμήμα του γονιδίου (ή ένα V και ένα τμήμα J σε μια ελαφριά αλυσίδα) (Εικόνα 9). Καθώς υπάρχουν πολλαπλά αντίγραφα του κάθε τύπου γονιδιακού τμήματος και διάφοροι συνδυασμοί των τμημάτων του γονιδίου που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή κάθε μεταβλητής περιοχής της ανοσοσφαιρίνης, αυτή η διαδικασία δημιουργεί έναν τεράστιο αριθμό αντισωμάτων, τα οποία λόγω των δομικών μοριακών διαφορών τους μπορούν να αναγνωρίσουν ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών αντιγόνων (84).

Ο μηχανισμός του V(D)J ανασυνδυασμού έχει ως εξής (85-92): Τα γονιδιακά τμήματα που μπορούν να ανασυνδυαστούν, φέρουν ειδικές γονιδιακές αλληλουχίες που ονομάζονται ακολουθίες RSS (Recombination Signal Sequence) (93, 94). Η εξαιρετικά συντηρούμενη περιοχή RSS, που περιλαμβάνει ένα μοτίβο από ένα επταμερές (heptamer) (CACAGTG) και ένα εννιαμερές (nonamer) (ACAAAAACA) με την παρέμβαση ενός διαχωριστικού τμήματος, μήκους 12 ή 23bp, επιτρέπει τον ανασυνδυασμό V(D)J του γονιδίου της ανοσοσφαιρίνης σύμφωνα με τον κανόνα «12/23» (ένα γονιδιακό τμήμα μπορεί να ανασυνδυαστεί μόνο με ένα άλλο γονιδιακό τμήμα το οποίο φέρει διαφορετικό διαχωριστικό) (95-100). Για παράδειγμα, σε μια απλουστευμένη διαδικασία ανασυνδυασμού V(D)J, τα V, D και J κωδικά τμήματα της ανοσοσφαιρίνης πλαισιώνονται από RSS, τα οποία είναι σε αντίθετες κατευθύνσεις στα 5' και 3' άκρα των κωδικών ακολουθιών. Δηλαδή, τα RSS βρίσκονται στο 3' άκρο του κάθε τμήματος V, τα 3' και 5' άκρα σε κάθε τμήμα D και στο 5' άκρο του κάθε τμήματος J. Ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που φέρει τα προϊόντα Rag 1 και Rag 2 (Recombination Activating Genes) ενώνονται ειδικά με τις ακολουθίες RSS. Τα μεμονωμένα γονιδιακά τμήματα, στα RSS των οποίων οι πρωτεΐνες Rag 1 και Rag 2 ενώνονται, επιλέγονται τυχαία από έναν αριθμό αντιγράφων που είναι



παρόντα σε κάθε γονιδιακό τόπο. Τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα Rag 1 και Rag 2 φέρουν μαζί τα γονιδιακά τμήματα που πρόκειται να ανασυνδυαστούν και κόβουν το DNA ακριβώς στο σημείο σύνδεσης του γονιδιακού τμήματος με το αντίστοιχο τμήμα RSS. Αυτή η τομή δημιουργεί ένα τμήμα DNA σε σχήμα «φουρκέτας» στο πέρας του γονιδιακού τμήματος και δίκλινα άκρα στο πέρας των RSS. Επιπλέον πρωτεΐνες, όπως η DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), η Ku (101-103), η Artemis (104) και ένα διμερές των DNA ligase και XRCC4 (105, 106), ενσωματώνονται σε ένα μεγάλο σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες Rag. Τα δύο τμήματα RSS ενώνονται, σχηματίζοντας το “signal joint”, ώστε να προκύψει ένα κυκλικό τμήμα DNA που δεν παίζει κάποιο ρόλο στη διαδικασία ανασυνδυασμού. Οι δομές φουρκέτας στο τέλος των γονιδιακών τμημάτων κόβονται και ένα άλλο ένζυμο, η πρωτεΐνη TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase), προσθέτει επιπλέον νουκλεοτίδια στα πέρατα των ελεύθερων πλέον άκρων του DNA (N νουκλεοτίδια) (92). Τα άλλα ένζυμα του συμπλόκου ενώνουν τις δύο αυτές ελεύθερες άκρες, φέρνοντας σε πέρας τη διαδικασία του ανασυνδυασμού.

Είναι δυνατόν κατά τη διάρκεια του ανασυνδυασμού να λάβει χώρα σχάση της μίας μόνο αλυσίδας του DNA στην περιοχή της «φουρκέτας». Αυτό οδηγεί στη δημιουργία μιας αλυσίδας με προεξέχοντα 3' ή 5' άκρα η οποία φέρει παλινδρομικά τα τελευταία νουκλεοτίδια της άλλης αλυσίδας (P nucleotides) (92, 107, 108).

Ειδικότερα, ο ανασυνδυασμός της βαριάς αλυσίδας ακολουθεί τα παρακάτω βήματα:

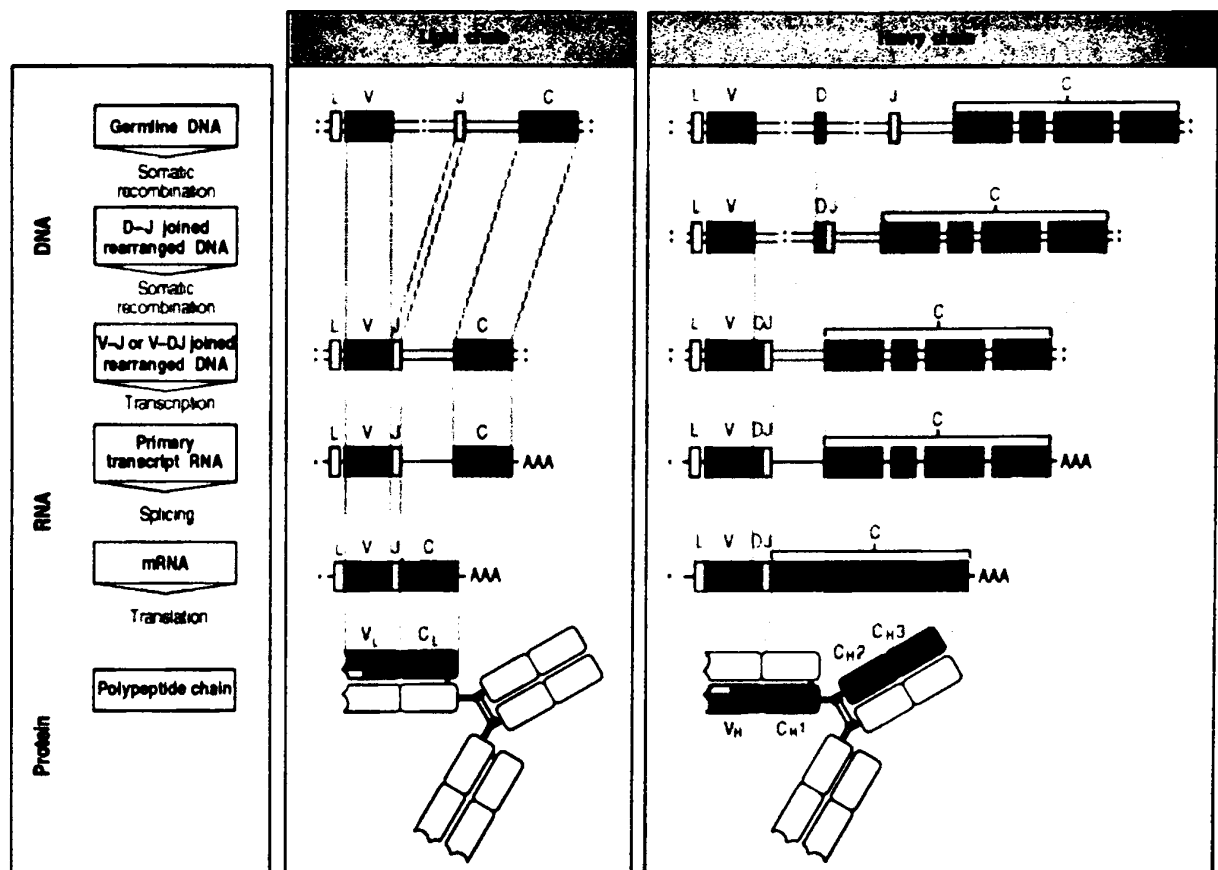
- Μια D και μια J ακολουθία συνενώνονται
- Ένα V τμήμα συνενώνεται με το τμήμα DJ και όλα τα παρεμβαίνοντα  $V_n$  και  $J_n$  απομακρύνονται. Αυτό φέρνει τα V, D και J τμήματα γονιδίων μαζί, σε ένα μεταγραφικό πλαίσιο ανάγνωσης, στο επίπεδο του DNA, δημιουργώντας ένα πολυαδενυλιωμένο προϊόν mRNA: leader exon, V, D, J, C, poly A.

Για την ελαφριά αλυσίδα ο ανασυνδυασμός έχει ως εξής:



- Αρχικά συνενώνονται μια V και μια J ακολουθία (στην ελαφριά αλυσίδα απουσιάζουν τα D γονίδια), με μερικές χιλιάδες ζευγάρια βάσεων να χωρίζουν τα J και C τμήματα.
- Στη συνέχεια αυτό μεταγράφεται σε ένα πολυαδενυλιωμένο πρωτογενές αντίγραφο και η παρεμβαίνουσα ακολουθία απομακρύνεται. Αυτό δημιουργεί ένα προϊόν mRNA: leader exon, V, J, C, poly A.

Αφ' ότου σε ένα Β-λεμφοκύτταρο παραχθεί ένα λειτουργικό γονίδιο ανοσοσφαιρίνης με την διαδικασία ανασυνδυασμού V(D)J, αυτό δεν μπορεί να εκφράσει οποιαδήποτε άλλη μεταβλητή περιοχή. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως αποκλεισμός αλληλομόρφου κι έτσι κάθε Β-κύτταρο μπορεί να παράγει αντισώματα που περιέχουν μόνο ένα είδος μεταβλητής αλυσίδας (109).



Εικ. 9: Ανασυνδυασμός βαρίας και ελαφριάς αλυσίδας (ανακτημένο στις 9/12/2010 από τον ιστότοπο <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)



## **B) Σωματική Υπερμετάλλαξη και Ωρίμανση Συγγένειας**

Μετά από την ενεργοποίηση με το αντιγόνο, τα Β-λεμφοκύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται με ταχείς ρυθμούς. Σε αυτά τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις μεταβλητές περιοχές των βαρέων και ελαφρών αλυσίδων υφίστανται ένα υψηλό ποσοστό σημειακών μεταλλάξεων με μια διαδικασία αποκαλούμενη ως σωματική υπερμετάλλαξη (SHM). Η SHM έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή περίπου ενός νουκλεοτιδίου ανά μεταβλητό γονίδιο, ανά κυτταρική διαίρεση (110, 111). Κατά συνέπεια, οποιαδήποτε θυγατρικά Β-λεμφοκύτταρα θα αποκτήσουν μικρές διαφορές αμινοξέος στους μεταβλητούς τομείς των αλυσίδων των αντισωμάτων τους.

Αυτό συντελεί στην αύξηση της ποικιλομορφίας των διαθέσιμων αντισωμάτων και έχει επιπτώσεις στη συγγένεια του αντισώματος με το αντιγόνο (112). Μερικές σημειακές μεταλλάξεις θα έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή αντισωμάτων που έχουν μια πιο αδύναμη αλληλεπίδραση (χαμηλή συγγένεια) με το ειδικό αντιγόνο από το αρχικό αντίσωμα, και ορισμένες μεταλλάξεις θα δημιουργήσουν αντισώματα με ισχυρότερη αλληλεπίδραση (υψηλής συγγένειας) (113). Τα Β-λεμφοκύτταρα που εκφράζουν υψηλά αντισώματα συγγένειας στην επιφάνειά τους, θα λάβουν ένα ισχυρό μήνυμα επιβίωσης κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης με άλλα κύτταρα, ενώ τα Β-λεμφοκύτταρα με αντισώματα χαμηλής συγγένειας δε θα έχουν και θα θανατωθούν με απόπτωση (113). Έτσι, τα Β-λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τα αντισώματα με τη μεγαλύτερη συγγένεια για το αντιγόνο θα ανταγωνίζονται εκείνα με ασθενέστερη συγγένεια για την επιβίωσή τους και την συμμετοχή τους στις ανοσοαποκρίσεις. Η διαδικασία της παραγωγής αντισωμάτων με αυξημένες δεσμευτικές συγγένειες ονομάζεται ωρίμανση συγγένειας. Η ωρίμανση συγγένειας εμφανίζεται σε ώριμα Β-λεμφοκύτταρα μετά τον ανασυνδυασμό V(D)J και εξαρτάται από τη βοήθεια των βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων (114).

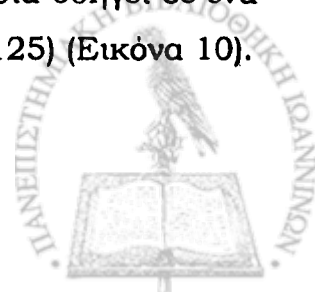




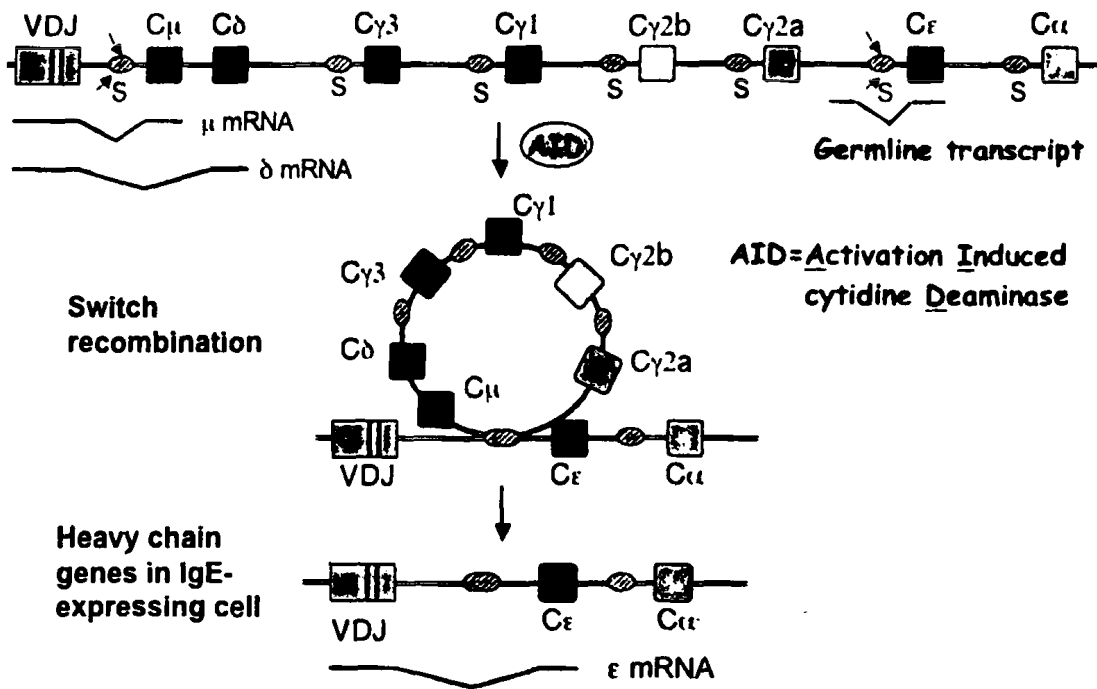
### Γ) Αλλαγή Τάξεως

Η αλλαγή ισοτύπου ή τάξεως είναι μια βιολογική διαδικασία που συμβαίνει μετά την ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων και η οποία επιτρέπει στο κύτταρο να παράγει διάφορες κατηγορίες αντισωμάτων (IgA, IgE ή IgG) (84, 115). Οι διάφορες τάξεις του αντισώματος καθορίζονται από τις σταθερές (C) περιοχές της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης. Αρχικά, τα ανώριμα Β-λεμφοκύτταρα εκφράζουν στην κυτταρική επιφάνειά τους μόνο τις ανοσοσφαιρίνες επιφανείας IgM και IgD με πανομοιότυπες περιοχές δέσμευσης αντιγόνων. Κάθε ισότυπος είναι προσαρμοσμένος για μια ξεχωριστή λειτουργία και ως εκ τούτου, μετά την ενεργοποίηση, ένα αντίσωμα με δραστική λειτουργία IgG, IgA, ή IgE μπορεί να απαιτείται για την αποτελεσματική εξάλειψη ενός αντιγόνου. Η αλλαγή τάξεως επιτρέπει στα διαφορετικά θυγατρικά κύτταρα από τον ίδιο ενεργοποιημένο Β-λεμφοκύτταρο να παράγουν τα αντισώματα των διαφόρων ισοτύπων. Μόνο η σταθερή περιοχή της βαριάς αλυσίδας του αντισώματος υφίσταται αλλαγές κατά τη διάρκεια της αλλαγής τάξεως. Οι μεταβλητές περιοχές και ως εκ τούτου και η ειδικότητα του αντιγόνου, παραμένουν αμετάβλητες. Η αλλαγή τάξεως ενεργοποιείται από τις κυτταροκίνες (IL-4, IL-5, TGFβ) και κατά συνέπεια, ο ισότυπος που παράγεται εξαρτάται από το ποιες κυτταροκίνες είναι παρούσες στο περιβάλλον των Β-λεμφοκυττάρων (115).

Η αλλαγή τάξεως λαμβάνει χώρα στην περιοχή της βαριάς αλυσίδας του γονιδιώματος από ένα μηχανισμό που ονομάζεται ανασυνδυασμός αλλαγής τάξεως (CSR - class switch recombination) (116). Ο μηχανισμός αυτός βασίζεται σε συντηρημένες αλληλουχίες, που ονομάζονται περιοχές αλλαγής (S), που βρέθηκαν στο DNA ανοδικά της κάθε σταθερής περιοχής του γονιδίου (εκτός από την αλυσίδα δ). Το DNA σπάει από τη δραστηριότητα μιας σειράς ενζύμων (AID/Activation-Induced Cytidine Deaminase, Uracil DNA Glycosylase) σε δύο επιλεγμένες περιοχές S (117). Το εξώνιο του μεταβλητού τομέα επανασυνδέεται μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται μη ομόλογη τελική ένωση (NHEJ - non-homologous end joining) (118-124) στην επιθυμητή σταθερή περιοχή (γ, α ή ε). Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί ένα αντίσωμα διαφορετικής τάξης (125) (Εικόνα 10).



### Heavy chain genes in IgM expressing cell



Εικ. 10: Αλλαγή τάξης (ανακτημένο στις 9/ 12/ 2010 από τον ιστότοπο <http://www.umassmed.edu>)

## 2.6. ΤΡΟΠΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Οι ανοσοσφαιρίνες συμμετέχουν στις ειδικές χυμικές αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος και έχουν την ιδιότητα να προλαμβάνουν την επέκταση ενδοκυττάρων λοιμώξεων. Είναι ειδικές έναντι του αντιγόνου που τις ενεργοποίησε και διατηρούν μνήμη του συμβάντος προσφέροντας με τον τρόπο αυτό μακροχρόνια ανοσία.

Με τον όρο αντιγόνο, εννοούμε κάθε ουσία η οποία αναγνωρίζεται ως ξένη από τον οργανισμό και μπορεί να πυροδοτήσει τις ειδικές (χυμικές και κυτταρικές) ανοσολογικές απαντήσεις. Η αντιγονικότητα μιας ουσίας εξαρτάται από το μοριακό της βάρος, από την πολυπλοκότητά της, από την οδό εισόδου στον οργανισμό, από την συγκέντρωσή της αλλά και από άλλους παράγοντες. Ουσίες μεγάλου μοριακού βάρους (>100κD) θεωρούνται ισχυρά αντιγόνα, αλλά και μικρομοριακές ουσίες (απτίνες) μπορούν να

πυροδοτήσουν μια ανοσολογική απάντηση μετά από σύνδεσή τους με μια πρωτεΐνη-φορέα.

Οι ανοσοσφαιρίνες μπορούν να αναγνωρίσουν ένα επιφανειακό τμήμα του αντιγόνου, το οποίο καλείται αντιγονικός καθοριστής ή επίτοπος. Το αντιγόνο μπορεί να φέρει στην επιφάνειά του έναν ή πολλούς ίδιους ή πολλούς διαφορετικούς επίτοπους. Για το λόγο αυτό, οι ανοσολογικές απαντήσεις μπορεί να είναι μονοκλωνικές, ολιγοκλωνικές ή πολυκλωνικές. Η σύνδεση ενός αντισώματος με ένα αντιγόνο είναι αμφίδρομη και επιτυγχάνεται μέσω ασθενών μη-ομοιοπολικών δεσμών.

Οι κυριότεροι τρόποι δράσης των ανοσοσφαιρινών είναι οι ακόλουθοι:

1. Εξουδετέρωση: Τα αντισώματα συνδέονται στην επιφάνεια των αντιγόνων αποτρέποντας με τον τρόπο αυτό τη σύνδεση των τελευταίων με υποδοχείς των κυττάρων του ξενιστή.
2. Ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος: Η σύνδεση αντισωμάτων IgG ή IgM στην επιφάνεια ενός αντιγόνου μπορεί να ενεργοποιήσει τον καταρράκτη των ενζύμων του συμπληρώματος και να οδηγήσει σε φαγοκυττάρωση ή κυτταρόλυση του αντιγόνου.
3. Οψωνινοποίηση: Αντιγόνα συνδεδεμένα με αντισώματα IgG αναγνωρίζονται από μακροφάγα και ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα και φαγοκυτταρώνονται.
4. Κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από αντισώματα (ADCC): Σύνδεση αντισωμάτων IgG με κύτταρα μπορεί να οδηγήσει στην καταστροφή των τελευταίων από NK-κύτταρα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και άλλα λευκοκύτταρα.
5. Άμεσου τύπου (τύπου I) υπερευαισθησία από IgE: Η υπερευαισθησία τύπου I εμφανίζεται όταν η απόκριση των αντισωμάτων IgE στρέφεται εναντίον αβλαβών περιβαλλοντικών αντιγόνων/αλλεργιογόνων (γύρη, ακάρεα). Σε αυτή την περίπτωση, αντισώματα τύπου IgE (κλάσμα Fc) συνδέονται με μαστοκύτταρα (σιτευτικά κύτταρα, mast cells). Η σύνδεση αυτή προκαλεί αποκοκκίωση, απελευθέρωση ουσιών όπως η ισταμίνη και οδηγεί



σε αντίδραση υπερευαισθησίας. Συμπτώματα της υπερευαισθησίας τύπου I από αντισώματα IgE είναι το άσθμα, το έκζεμα και η αλλεργική ρινίτις.

## 2.7. ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Σχεδόν όλα τα μικρόβια μπορεί να προκαλέσουν μια ανοσολογική αντίδραση. Η επιτυχής αναγνώριση και εξάλειψη των πολλών διαφορετικών ειδών μικροβίων απαιτεί πολυμορφία μεταξύ των αντισωμάτων. Η αμινοξική τους σύσταση ποικίλλει, επιτρέποντάς τους να αναγνωρίζουν πολλά διαφορετικά αντιγόνα. Εκτιμάται ότι οι άνθρωποι παράγουν περίπου  $10^9$  διαφορετικά αντισώματα, κάθε ένα από τα οποία είναι ικανό να δεσμεύει ένα συγκεκριμένο επίτοπο του αντιγόνου (126). Παρά το γεγονός ότι ένα τεράστιο πλήθος διαφορετικών αντισωμάτων παράγεται σε ένα μόνο άτομο, ο αριθμός των γονιδίων διαθέσιμων να παράγουν αυτές τις πρωτεΐνες περιορίζονται από το μέγεθος του ανθρώπινου γονιδιώματος. Αρκετά περίπλοκοι γενετικοί μηχανισμοί έχουν εξελιχθεί που επιτρέπουν στα Β-λεμφοκύτταρα να παράγουν μια ποικίλη ομάδα αντισωμάτων από ένα σχετικά μικρό αριθμό γονιδίων (83).

Κατά την πάροδο των χρόνων, έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες που προσπάθησαν να εξηγήσουν τη δημιουργία των αντισωμάτων. Η θεωρία του Ehrlich (127) περί πλευρικής αλυσίδας ανέφερε ότι η σύνδεση ενός αντιγόνου με έναν προϋπάρχοντα Β-κυτταρικό υποδοχέα, προκαλούσε την περαιτέρω σύνθεση και έκκριση ίδιων υποδοχέων από το κύτταρο. Μετά από αμφισβήτηση του Landsteiner σχετικά με την ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να αποκτήσει και να διατηρήσει, μέσω της φυσικής επιλογής, γονίδια που να κωδικοποιούν για αντισώματα έναντι νέων, τεχνητά παραγόμενων αντιγόνων, προέκυψε η καθοδηγητική υπόθεση (128). Η παραπάνω υπόθεση προτείνει ένα εύπλαστο μόριο, στο οποίο, μετά από αλληλεπίδραση με το αντιγόνο, σχηματίζεται μια συμπληρωματική θέση



δέσμευσης. Τέλος, οι Jerne και Burnet (129, 130), μέσω της θεωρίας της κλωνικής επιλογής, υποστήριξαν ότι κάθε λεμφοκύτταρο παράγει ένα συγκεκριμένο τύπο ανοσοσφαιρίνης και το εκάστοτε αντιγόνο «επιλέγει» και διεγείρει τα κύτταρα που φέρουν αυτόν τον τύπο ανοσοσφαιρίνης.

Ωστόσο, καμία από τις παραπάνω θεωρίες δεν μπορούσε να εξηγήσει τη μεγάλη ποικιλότητα του αριθμού των αντισωμάτων. Σήμερα η ποικιλότητα των ανοσοσφαιρινών αποδίδεται σε διάφορες αιτίες και μπορεί να προκύψει σε διαφορετικά στάδια κατά την παραγωγή των ανοσοσφαιρινών:

1. Όπως έχει αναφερθεί στην παράγραφο σχετικά με τη μορφολογία των ανοσοσφαιρινών (2.3 Μορφολογία και οικογένειες ανοσοσφαιρινών), οι ανοσοσφαιρίνες αποτελούνται από δύο βαριές και δύο ελαφριές αλυσίδες, ενώ οι ελαφριές αλυσίδες μπορεί να είναι είτε κ είτε λ. Καθώς οποιαδήποτε βαριά αλυσίδα μπορεί να συνδυαστεί με οποιαδήποτε ελαφριά, ο αριθμός των διαφορετικών αντισωμάτων είναι ίσος με το γινόμενο του αριθμού των βαριών και των ελαφριών αλυσίδων.

2. Ενώ οι σταθερές περιοχές των αλυσίδων κωδικοποιούνται από ένα ή ελάχιστα γονίδια, οι μεταβλητές περιοχές κωδικοποιούνται από πληθώρα V, D, J γονιδίων.

3. Οι Wu και Kabat απέδειξαν το 1970 (131) ότι η μεταβλητότητα τόσο της ελαφριάς, όσο και της βαριάς αλυσίδας είναι επικεντρωμένη σε τρεις υπερμετάβλητες περιοχές οι οποίες περιβάλλονται από πλαίσια σχετικά αμετάβλητων αλληλουχιών (Frameworks/FRs). Όπως αποδείχτηκε αργότερα, οι περιοχές αυτές είναι οι περιοχές επαφής με το αντιγόνο και καλούνται περιοχές καθορισμού συμπληρωματικότητας (Complementary Determining Regions - CDRs). Η ιδιότυπη ποικιλότητα φαίνεται να ευθύνεται για το 5% της συνολικής ποικιλότητας των ανοσοσφαιρινών.

4. Κατά το γονιδιακό ανασυνδυασμό των ανοσοσφαιρινών, είναι δυνατόν να γίνει ασύμμετρο άνοιγμα των κωδικοποιητικών άκρων της δομής φουρκέτας, με αποτέλεσμα την παραγωγή μη συμπληρωματικών αλληλουχιών που ενσωματώνονται στις γονιδιακές περιοχές. Τα εν λόγω νουκλεοτίδια καλούνται P (Palindromic). Επιπλέον, είναι πιθανό στο 3' άκρο της αλληλουχίας μεταξύ των V και D γονιδίων, καθώς και μεταξύ των D και J



γονιδίων να προστεθούν τυχαία N (Non - templated) νουκλεοτίδια με την δράση του ενζύμου τερματική δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση (TdT). Η προσθήκη των N νουκλεοτιδίων ονομάζεται ποικιλότητα της N-περιοχής, η οποία δεν κωδικοποιείται από τη γενετική σειρά.

5. Το φαινόμενο της σωματικής μεταλλαγής αφορά σε μεταλλάξεις οι οποίες συμβαίνουν σε σωματικά χρωμοσώματα, ενώ τα Β-λεμφοκύτταρα είναι ακόμα στο βλαστικό κέντρο και οφείλονται σε σημειακές αλλαγές βάσεων. Στη σωματική μεταλλαγή συμμετέχουν ένζυμα όπως η Activating Induced Cytidine Deaminase AID, η οποία μετατρέπει κυτοσίνες (C) σε ουρακίλες (U) και η Uracil-DNA Glycosylase, η οποία απομακρύνει ουρακίλες (U).

6. Σε αρκετά τμήματα των V και J γονιδίων είναι δυνατόν να ενσωματωθούν περιοχές ψευδογονιδίων, οι οποίες μεταβάλλουν την αλληλουχία του DNA (γονιδιακή μετατροπή).

7. Τέλος, τα D γονίδια που απαντώνται μόνο στη βαριά αλυσίδα των ανοσοσφαιρινών, είναι ιδιαίτερος μεταβλητά όσον αφορά τόσο στον αριθμό των κωδικονίων όσο και στην αλληλουχία τους. Επιπλέον, η D περιοχή μπορεί να αναγνωστεί σωστά με τρία διαφορετικά πλαίσια ανάγνωσης (Reading Frame - RF), γεγονός που συμβάλλει στην αύξηση της ποικιλότητας.



## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι:

1. Η διαπίστωση πιθανής μονοκλωνικότητας και η ανίχνευση των κλωνικών αναδιατάξεων των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας του υποδοχέα των Β-λεμφοκυττάρων, σε ιστολογικά δείγματα ασθενών με διάγνωση «διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα (DLBCL)», με τη χρήση μοριακών τεχνικών (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης).
2. Η εύρεση της συνηθέστερα παρατηρούμενης αναδιάταξης σε πάσχοντες από DLBCL στην περιοχή της Ηπείρου.
3. Η αλληλούχιση των αναδιατάξεων αυτών και η μετέπειτα σύγκρισή τους με τις ήδη κατατεθειμένες αναδιατάξεις σε παγκόσμια βάση δεδομένων.



# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 1. ΥΛΙΚΑ

### 1.1. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικά δείγματα μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισθέντα σε παραφίνη (FFPE), καθώς και νωπά ιστολογικά δείγματα βαθειάς κατάψυξης. Όλα τα δείγματα προήλθαν από ασθενείς του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

### 1.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε τόσο υγρό θρεπτικό υλικό (Luria Broth/L.B.), όσο και στερεό θρεπτικό υλικό (Luria Agar/L.A.).

Η σύσταση του υγρού θρεπτικού υλικού (L.B.) ήταν:

- 1% Tryptone,
- 0.5% Yeast extract και
- 1% NaCl

Η σύσταση του στερεού θρεπτικού υλικού (L.A.) ήταν:

- 1% Tryptone,
- 0.5% Yeast extract
- 1% NaCl και
- 1.5% Agar





Η ρύθμιση του pH=7 για όλα τα θρεπτικά υλικά έγινε με προσθήκη NaOH.

Η προετοιμασία των θρεπτικών υλικών περιλάμβανε τη διάλυση των επι μέρους συστατικών τους σε απεσταγμένο νερό και την αποστείρωσή τους για 20min στους 120°C υπό πίεση 15psi με τη βοήθεια της συσκευής Prestige Medical Series 2100 Clinical Autoclave (Εικόνα 11).

Το στερεό θρεπτικό υλικό επιστρώθηκε σε τρυβλία και χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη αποικιών από μετασχηματισμένα κύτταρα, ενώ το υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε για την υγρή καλλιέργεια επιλεγμένων αποικιών. Μετά την προετοιμασία τους, τα θρεπτικά υλικά αποθηκεύτηκαν στους 4°C.



Εικ. 11: Συσκευή αποστείρωσης Prestige Medical Series 2100 Clinical Autoclave

### 1.3. ANTIBIOTIKA

Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή ανθεκτικών αποικιών ήταν η καναμυκίνη (Kan). Το εν λόγω αντιβιοτικό έχει την ικανότητα να προσδένεται στο 70S ριβόσωμα με αποτέλεσμα να προκαλούνται λάθη κατά την ανάγνωση του αγγελιοφόρου RNA (mRNA). Πλασμίδια τα οποία φέρουν το γονίδιο *kam* έχουν την ικανότητα να κωδικοποιούν την τρανσφεράση των αμινογλυκοσιδίων, η οποία τροποποιεί την καναμυκίνη και εμποδίζει τη μεταφορά της στο εσωτερικό του κυττάρου. Με τον τρόπο αυτό, βακτήρια που φέρουν πλασμίδια με το γονίδιο *kam* έχουν ανοσία στο αντιβιοτικό καναμυκίνη.

Το υδατικό διάλυμα της καναμυκίνης αποστειρώθηκε με διήθηση μέσω αποστειρωμένων φίλτρων νιτρικής κυτταρίνης, μεγέθους πόρων 0,45 μm. Το αντιβιοτικό προστέθηκε στα θρεπτικά μέσα μετά από την αποστείρωση των τελευταίων και όταν η θερμοκρασία τους είχε μειωθεί στους 45-50°C. Η τελική συγκέντρωση της Καναμυκίνης στα θρεπτικά υλικά ήταν 50μg/ml.

### 1.4. ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΕΣ

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση Platinum® Taq DNA της εταιρίας Invitrogen (Cat.No. 10966-018), η ενεργότητα της οποίας είναι 5Units/μl. Η συγκεκριμένη πολυμεράση είναι ουσιαστικά ένα σύμπλοκο της Taq DNA πολυμεράσης με ένα ειδικό αντίσωμα το οποίο μπλοκάρει την ενζυμική της δράση σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Αναίρεση της ενζυμικής αναστολής επιτυγχάνεται με το αρχικό στάδιο θέρμανσης του ενζύμου στους 94°C για 2min, δημιουργώντας κατά αυτόν τον τρόπο συνθήκες “hot start” PCR(132, 133). Επιπλέον, έχει την ικανότητα να δρα ως τρανσφεράση προσθέτοντας μία επιπλέον βάση Αδενίνης στο 3' άκρο του προϊόντος της PCR, δημιουργώντας κατά αυτόν τον τρόπο “κολλώδη άκρα” (sticky ends).



Η σύσταση του διαλύματος φύλαξης της Platinum® Taq DNA πολυμεράσης είναι η ακόλουθη:

- 20mM Tris-HCl pH=8
- 40mM NaCl
- 2mM NaPO<sub>4</sub>
- 0,1mM EDTA
- 1mM DTT
- 50% (v/v) Γλυκερόλη (Glycerol)
- Σταθεροποιητές (Stabilizers)

Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης είναι:

- 200mM Tris-HCl pH=8,4
- 500mM KCl

Τα κατιόντα Mg<sup>+2</sup> διατίθενται σε διάλυμα MgCl<sub>2</sub> συγκέντρωσης 50mM.

Δοκιμαστικές αντιδράσεις PCR έγιναν και με τις ακόλουθες πολυμεράσες:

1. Taq DNA Polymerase της εταιρίας Invitrogen (Cat. No. 18038-018). Η Taq πολυμεράση έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* YT1 και έχει μέγεθος περίπου 94kDa. Παρέχεται σε ενεργότητα 5U/μl.
2. Platinum® Pfx DNA Polymerase της εταιρίας Invitrogen (Cat. No. 11708-013). Η συγκεκριμένη πολυμεράση είναι ανασυνδυασμένη DNA πολυμεράση από το στέλεχος KOD του βακτηρίου *Thermococcus* sp.(134, 135). Παρέχεται σε ανενεργή μορφή, λόγω σύνδεσης με το αντίσωμα Platinum®, αλλά αναίρεση της



ενζυμικής αναστολής μπορεί να επιτευχθεί με ένα αρχικό στάδιο θέρμανσης του ενζύμου στους 94°C για 2min, δημιουργώντας κατά αυτόν τον τρόπο συνθήκες “hot start” PCR (132) και αυξάνοντας την ευαισθησία, την ειδικευση και την απόδοση του ενζύμου. Παρέχεται σε ενεργότητα 2,5U/μl.

Για περιοχές πλούσιες σε GC ή για περιοχές που παρουσιάζουν δυσκολία ενίσχυσης, παρέχεται ένα ειδικό ενισχυτικό διάλυμα (Enhancer Solution).

3. Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity της εταιρίας Invitrogen (Cat. No. 11304-011). Αυτό το ένζυμο είναι ένα σύμπλοκο ανασυνδυασμένης Taq πολυμεράσης, της πολυμεράσης του βακτηρίου *Pyrococcus sp.* GB-D και του αντισώματος Platinum® Taq(136). Παρέχεται σε ενεργότητα 5U/μl και λόγω του αντισώματος Platinum® απαιτεί ένα αρχικό στάδιο θέρμανσης, όπως και η Platinum® Pfx πολυμεράση(132).

Κύριο χαρακτηριστικό της είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση μικρών αλλά και μεγάλων (12-20kb) περιοχών DNA και επίσης ότι έχει την ικανότητα να δρα ως τρανσφεράση προσθέτοντας μία επιπλέον βάση Αδενίνης στο 3' άκρο του προϊόντος της PCR.

## 1.5. ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν ως πριμοδοτικά μόρια για τις αντιδράσεις PCR τα ολιγονουκλεοτίδια που περιέχονταν στο πακέτο υλικών της εταιρίας InVivoScribe Technologies IGH Gene Rearrangement Assay για τον Β-κυτταρικό υποδοχέα. Η αλληλουχία των εν λόγω πριμοδοτικών μορίων αποτελεί ιδιοκτησία της εταιρίας InVivoScribe Technologies και δεν είναι γνωστή.



Ωστόσο, έγιναν δοκιμές και με άλλα ζεύγη πριμοδοτικών μορίων, καθώς και αντιδράσεις PCR για τον έλεγχο της ποιότητας του απομονωθέντος γενετικού υλικού. Τα πριμοδοτικά μόρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, περιγράφονται στον ακόλουθο πίνακα:

ΟΝΟΜΑ	ΦΟΡΑ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	ΜΗΚΟΣ (νουκλ.)	ΑΝΑΦΟΡΑ
FR1-A/B	F	5'-GGT GCA GCT GGT G(G/C)A GTC-3'	18	Meier <i>et al.</i> (137)
FR1-C	F	5'-GGT GCA GCT GCA GGA GTC-3'	18	
FR1-V4	F	5'-GAC CCT CTC CCT CAC CTG (C/T)G-3'	20	
FR1-V-1/7	F	5'-CCT CAG TGA AGG T(C/T)T CCT GC-3'	20	
FR1-V2	F	5'-ACC TTG A(A/G)G GAG TCT GGT CC-3'	20	
FR3A	F	5'-GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT-3'	24	
FR3B	F	5'-GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT-3'	24	
JOIN A	R	5'-CCT GAG GAG ACG GTG ACC-3'	18	
JOIN B	R	5'-CCT GAA GAG ACG GTG ACC A-3'	19	
JOIN C	R	5'-CCT GAG GAG ACA GTG ACC AG-3'	20	
#1541 (FR3)	F	5'-CTG TCG ACA CGG CCG TGT ATT ACT-3'	24	Mishima <i>et al.</i> (138)
#1542 (FR3A)	F	5'-ACA CGG C(C/T)(G/C) TGT ATT ACT GT-3'	20	
#1543 (FR2)	F	5'-TGG (A/G)TC CG(C/A) CAG (G/C)C(C/T) (C/T)C(A/G/C/T) GG-3'	20	
#1544 (JH)	R	5'-AAC TGC AGA GGA GAC GGT GAC C-3'	22	
#1545 (LJH)	R	5'-TGA GGA GAC GGT GAC C-3'	16	
#1546 (VLJH)	R	5'-GTG ACC AGG T(A/G/C/T)C CTT GGC CCC AG- 3'	23	
β-GLOBIN 1	F	5'-GCC ATC ACT AAA GGC ACC GAG C-3'	22	Meier <i>et al.</i> (137)
REV β-GLOBIN 2	R	5'-ATG GTG CAC CTG ACT CCT GAG G-3'	22	

Όπου A: Αδερίνη, G: Γουανίνη, C: Κυτοσίνη και T: Θυμίνη



Οι Meier *et al.*(137) μελέτησαν την κλωνικότητα του Β-κυτταρικού υποδοχέα σε 54 περιπτώσεις Β λεμφωμάτων, εκ των οποίων τα 11 ήταν λεμφώματα του μανδύα (mantle cell lymphomas) και 25 ήταν λεμφοζυδιακά λεμφώματα (follicular lymphomas). Όλα τα δείγματα ήταν μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισθέντα σε παραφίνη (FFPE), ενώ ως αρνητικό μάρτυρα στις αντιδράσεις PCR χρησιμοποίησαν περιπτώσεις αντιδραστικής λεμφαδενίτιδας. Τα πριμοδοτικά μόρια που χρησιμοποίησαν αναγνώριζαν ως στόχους δύο από τα τρία πλαίσια του Β-κυτταρικού υποδοχέα (FR1, FR3).

Οι Mishima *et al.*(138) μελέτησαν 12 περιπτώσεις λεμφωμάτων σε ρινικές ή οφθαλμικές κοιλότητες και 6 περιστατικά όπου υπήρχαν ενδείξεις για ανάπτυξη λεμφώματος. Όλα τα δείγματα ήταν μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισθέντα σε παραφίνη (FFPE) και για την ανάλυση κλωνικότητας του Β-κυτταρικού υποδοχέα χρησιμοποίησαν πριμοδοτικά μόρια για δύο από τα τρία πλαίσια του Β-κυτταρικού υποδοχέα (FR2, FR3). Μέσω της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης κατάφεραν να επιβεβαιώσουν την ύπαρξη μονοκλωνικότητας σε 16 από τις 18 περιπτώσεις (89%).

## 1.6. ΠΡΟΤΥΠΑ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΒΑΡΩΝ

Ως πρότυπα μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα:

- TrackIt™ 100bp DNA Ladder της εταιρίας Invitrogen (Cat.No. 10488-058), ως πρότυπο για μικρομοριακά τμήματα DNA (100-1500bp). Το συγκεκριμένο πρότυπο μοριακών βαρών αποτελείται από πλασμίδιο, το οποίο περιέχει έως 15 επαναλήψεις ενός τμήματος DNA μεγέθους 100bp και ένα επιπλέον τμήμα DNA μεγέθους 2072bp.



Το διάλυμα φύλαξης του TrackIt™ 100bp DNA Ladder αποτελείται από: 10mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM EDTA pH8, 0,06% XCFF, 0,6% Tartrazine, 5% Glycerol.

- TrackIt™ λ DNA/*Hind* III Ladder της εταιρίας Invitrogen (Cat.No. 10488-064), ως πρότυπο για μεγαλομοριακά τμήματα DNA (123bp-23,1 kb). Το συγκεκριμένο πρότυπο μοριακών βαρών αποτελείται από 7 ζώνες DNA οι οποίες προέρχονται από την πέψη του γενετικού υλικού του βακτηριοφάγου λ (clind1ts857 Sam7) μετά από πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Hind* III.

Το διάλυμα φύλαξης του TrackIt™ 100bp DNA Ladder έχει ως εξής: 10mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM EDTA pH8, 0,06% XCFF, 0,4% Orange G, 0,5% Glycerol, 1mM NaCl

## 1.7. ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες ζευγών βάσεων (συνήθως 4-6 ζεύγη) στο DNA και έχουν την ικανότητα να διασπάζουν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που συγκρατούν δύο γειτονικές βάσεις και στις δύο αλυσίδες του DNA, εντός της περιοχής αναγνώρισης.

Το περιοριστικό ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή ήταν η ενδονουκλεάση *EcoRI* της εταιρίας TaKaRa (Cat.No. 1040A). Η ενδονουκλεάση *EcoRI* μπορεί να αναγνωρίζει την αλληλουχία GAATTC και στις δύο αλυσίδες του DNA και να διασπά το φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ της Γουανίνης (G) και της γειτονικής της Αδενίνης (A).

Η σύσταση του διαλύματος φύλαξης της *EcoRI* έχει ως εξής:



- 10mM Tris-HCl, pH=7.5
- 100mM KCl
- 0,1mM EDTA
- 1mM DTT
- 0,15% Triton X-100
- 0,01% BSA
- 50% Glycerol

Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος Η που χρησιμοποιήθηκε με την *EcoRI* έχει ως εξής:

- 500mM Tris-HCl, pH=7.5
- 100mM MgCl<sub>2</sub>
- 10mM Dithiothreitol
- 1000mM NaCl

## 1.8. ΠΑΚΕΤΑ ΥΛΙΚΩΝ

Για την παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα πακέτα υλικών:

1. Πακέτο απομόνωσης χρωμοσωμικού DNA της εταιρίας Macherey –Nagel (Genomic Tissue NucleoSpin® Tissue, Cat. No. 740952.50)
2. Πακέτο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA της εταιρίας Macherey – Nagel (Plasmid DNA Purification NucleoSpin® Plasmid, Cat. No. 740588.50)
3. Πακέτο καθαρισμού DNA της εταιρίας Promega (Wizard® DNA Clean-Up System, Cat. No. A7280)
4. Πακέτο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για τον Β-κυτταρικό υποδοχέα της εταιρίας InVivoScribe Technologies (IGH Gene Rearrangement Assay, Cat. No. 1-101-0010)





5. Πακέτο καθαρισμού του DNA από αгарόζη της εταιρίας Macherey - Nagel (PCR clean-up Gel extraction NucleoSpin® Extract II, Cat. No. 740609.50)
6. Πακέτο κλωνοποίησης και μετασχηματισμού χημικώς επιδεκτικών κυττάρων E.Coli της εταιρίας Invitrogen (TOPO TA Cloning® Kit Dual Promoter, Cat. No. K461020)



## 2. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την αποπαραφίνωση των δειγμάτων που έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμόλη και έχουν εγκλεισθεί σε παραφίνη είναι των Greer et al.(139) με μικρές τροποποιήσεις. Η διαδικασία της αποπαραφίνωσης έχει ως εξής:

- Με μικροτόμο πραγματοποιούνται περίπου 10 τομές παραφίνης των 10μm (περίπου 25mg ιστού) και απομακρύνεται η περίσσεια παραφίνης. Οι τομές τοποθετούνται σε μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες.
- Προστίθεται 1ml ξυλόλης προθερμασμένης στους 40°C και το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά (Vortex). Κατόπιν, το δείγμα επώάζεται για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Τελείται vortex ανά διαστήματα.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 3min στις 11000g.
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 1ml αιθανόλης 100%. Τα δείγματα ανακινούνται ελαφρά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 3min στις 11000g και απομακρύνεται το υπερκείμενο.
- Επαναλαμβάνονται τα δύο προηγούμενα βήματα.
- Οι μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες τοποθετούνται σε κλίβανο στους 37°C μέχρι την πλήρη ξήρανση του ιζήματος.

Η διαδικασία της απομόνωσης του χρωμοσωμικού DNA μπορεί να ξεκινήσει μετά το πέρας της αποπαραφίνωσης. Δείγματα τα οποία προέρχονται από φρέσκο ιστό δε χρειάζεται να υποστούν την παραπάνω διαδικασία.

Πριν από την απομόνωση του χρωμοσωμικού DNA πρέπει να γίνει λύση των κυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται με ολονύκτια επώασή τους στους 56°C



μετά από προσθήκη 180μl διαλύματος T1 και 25μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K (πακέτο απομόνωσης χρωμοσωμικού DNA της Macherey-Nagel). Εάν μετά την ολονύκτια επώαση των δειγμάτων υπάρχουν ακόμα διακριτά τμήματα ιστού, δεν έχει επέλθει δηλαδή πλήρης κυτταρική λύση, μπορεί να προστεθεί ποσότητα διαλύματος T1 και πρωτεΐνάσης K σε αναλογία 7,2:1.

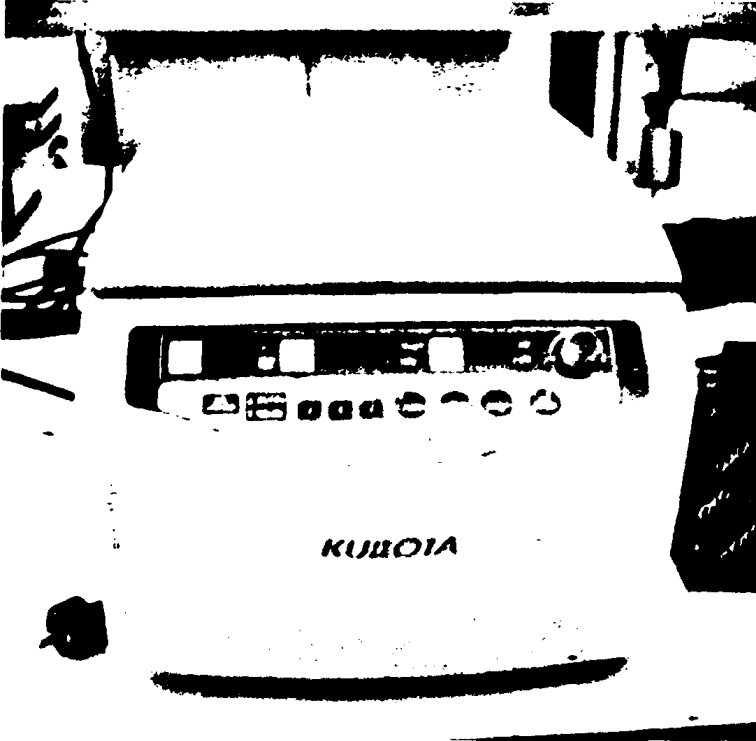
Μετά το πέρας της κυτταρικής λύσης ξεκινά η διαδικασία απομόνωσης χρωμοσωμικού DNA:

- Γίνεται ισχυρή ανάδευση και προστίθενται 200μl διαλύματος B3. Το δείγμα αναδεύεται εκ νέου και επωάζεται για 10min στους 70°C.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5min στις 11000g και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα.
- Προστίθενται 210μl αιθανόλης 100% και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση.
- Το δείγμα φορτώνεται σε ειδική στήλη και φυγοκεντρείται για 1min στις 11000g. Ακολούθως απομακρύνεται το υπερκείμενο.
- 1<sup>η</sup> πλύση: προστίθενται 500μl διαλύματος BW. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 1min στις 11000g και απομακρύνεται το υπερκείμενο.
- 2<sup>η</sup> πλύση: προστίθενται 600μl διαλύματος B5. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 1min στις 11000g και απομακρύνεται το υπερκείμενο.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για 2min στις 11000g και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα.
- Προστίθενται είτε 20μl διαλύματος έκλουσης προθερμασμένου στους 70°C όταν πρόκειται για ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη και εγκλεισθέντες σε παραφίνη, είτε 35μl διαλύματος έκλουσης προθερμασμένου στους 70°C όταν πρόκειται για φρέσκους ιστούς. Το δείγμα επωάζεται για 3min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρείται για 1min στις 11000g.
- Επαναλαμβάνεται το προηγούμενο βήμα.
- Το DNA συλλέγεται σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και αποθηκεύεται στους -20°C.



Οι φυγοκεντρήσεις τελέστηκαν με τη φυγόκεντρο 3500 Kubota (Εικόνα 12).

Μετά το πέρας της απομόνωσης του χρωμοσωμικού DNA, ηλεκτροφορούνται 10μl DNA σε πηκτή αγαρόζης 0,7%.



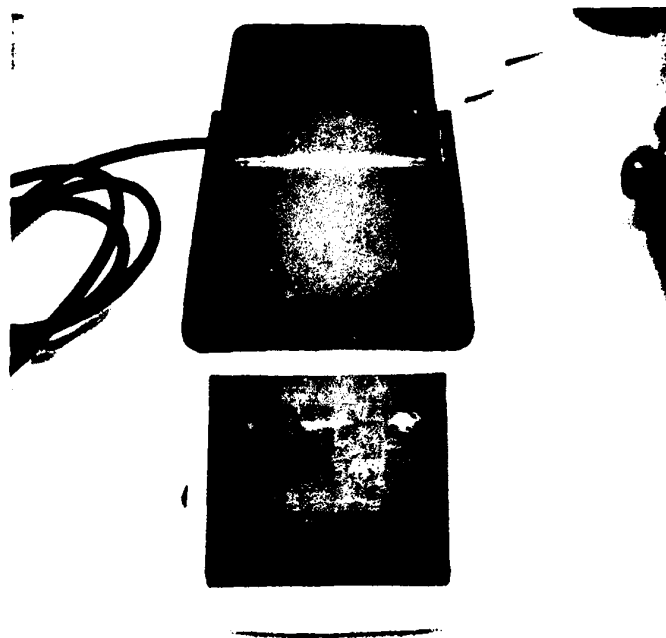
Εικ. 12: Φυγόκεντρος 3500 Kubota.

## 2.2. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΦΡΕΣΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Τα δείγματα τα οποία προέρχονταν από φρέσκο ιστό υπέστησαν ομογενοποίηση πριν τη διαδικασία απομόνωσης χρωμοσωμικού DNA.

Η ομογενοποίηση έγινε με χρήση της συσκευής Mini-Beadbeater της εταιρίας Biospec και με τη βοήθεια μεταλλικών σφαιριδίων (Εικόνα 13).

5



*Εικ. 13: Συσκευή ομογενοποίησης Mini-Beadbeater.*

### **2.3. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA**

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε το ειδικό πακέτο απομόνωσης Macherey-Nagel.

Το πρωτόκολλο έχει ως εξής:

- Φυγοκεντρώνεται 4ml καλλιέργειας για 30sec στις 11000g και απομακρύνεται το υπερκείμενο.
- Προστίθενται 250μl διαλύματος A1 (4°C) και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση.
- Ακολούθως προστίθενται 250μl διαλύματος A2 και το δείγμα αφού αναδευτεί ήπια, επώάζεται για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προστίθενται 300μl διαλύματος A3 και το δείγμα αναδύεται ελαφρά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10min στις 11000g και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε ειδική στήλη.

- Το δείγμα φυγοκεντρείται εκ νέου για 1min στις 11000g.
- Προστίθενται 500μl διαλύματος AW προθερμασμένου στους 50°C και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1min στις 11000g.
- Προστίθενται 600μl διαλύματος A4 και το δείγμα φυγοκεντρείται για 1min/11000g.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται εκ νέου για 2min στις 11000g.
- Προστίθενται 20μl διαλύματος έκλουσης AE προθερμασμένου στους 70°C, το δείγμα επωάζεται για 3min σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν φυγοκεντρείται για 1min στις 11000g.
- Επαναλαμβάνεται το προηγούμενο βήμα.
- Το DNA συλλέγεται σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και αποθηκεύεται στους -20°C.

Μετά το πέρας της απομόνωσης του πλασμιδιακού DNA, ηλεκτροφορούνται 10μl DNA σε πηκτική αγαρόζης 0,7%.

#### **2.4. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ DNA ΜΕ ΤΟ ΠΑΚΕΤΟ ΥΛΙΚΩΝ WIZARD® DNA CLEAN-UP SYSTEM**

Για τον καθαρισμό του χρωμοσωμικού DNA μετά την απομόνωσή του χρησιμοποιήθηκε το πακέτο υλικών Wizard® DNA Clean-Up System της εταιρίας Promega.

Το πρωτόκολλο καθαρισμού έχει ως εξής:

- Μεταφέρονται 50μl του DNA σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα. Σε περίπτωση που το διάλυμα DNA έχει όγκο μικρότερο από 50μl, προστίθεται απεσταγμένο νερό έως τελικού όγκου 50μl.



- Προστίθεται 1ml διαλύματος Wizard® DNA Clean-Up Resin και το μείγμα αναδεύεται ήπια.
- Μεταφορά του μείγματος σε σύριγγα των 3ml, η οποία είναι συνδεδεμένη με στήλη Wizard® Minicolumn.
- Μεταφορά του μείγματος στη στήλη Wizard® Minicolumn μέσω πίεσης στο έμβολο της σύριγγας.
- Προσθήκη 2ml ισοπροπανόλης (propanol-2) 80% στη σύριγγα και μεταφορά της στη στήλη Wizard® Minicolumn μέσω πίεσης στο έμβολο της σύριγγας.
- Φυγοκέντρηση της στήλης 2min/10.000g.
- Ξήρανση της στήλης για 5min σε θερμοκρασία δωματίου (R.T.).
- Προσθήκη 30ml απεσταγμένου νερού προθερμασμένου στους 80%. Επώαση 1min/R.T..
- Φυγοκέντρηση 20sec/10.000g.
- Το DNA συλλέγεται σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και αποθηκεύεται στους -20°C.

## 2.5. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗΣ DNA

Η διαδικασία καταβύθισης του απομονωθέντος DNA έχει σκοπό την αύξηση της καθαρότητας του DNA, μέσω της απομάκρυνσης ανεπιθύμητων μορίων, ώστε αυτό να χρησιμοποιηθεί αργότερα σε αντιδράσεις PCR.

Το πρωτόκολλο καταβύθισης είχε ως εξής:

- Προσθήκη 1/10 του όγκου του προς καταβύθιση DNA, sodium acetate 3M (pH=5,2)
- Προσθήκη 2,5 του όγκου του προς καταβύθιση DNA, απόλυτης αιθανόλης (100%)
- Επώαση για 30min στους -20°C
- Φυγοκέντρηση 15min/10.000

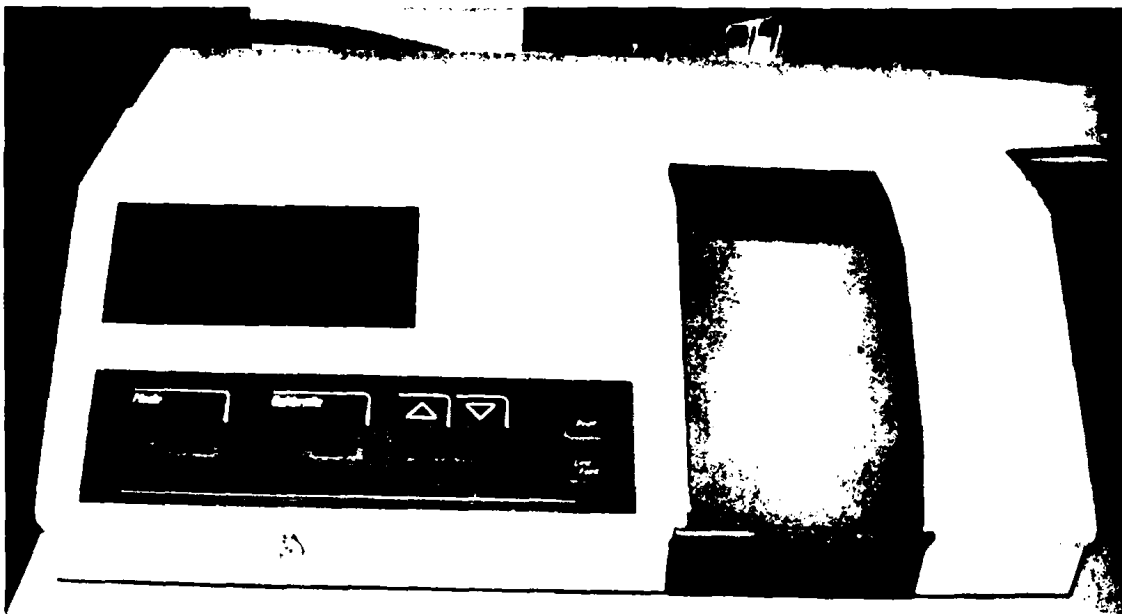


- Απόρριψη υπερκειμένου
- Επαναίωση σε 2,5 του όγκου του προς καταβύθιση DNA με αιθανόλη 70% (-20°C)
- Φυγοκέντρηση 15min/10.000
- Απόρριψη υπερκειμένου
- Επώαση στους 40°C έως πλήρους εξάτμισης της αιθανόλης
- Επαναίωση σε 20ml απεσταγμένου νερού

## 2.6. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗΣ DNA

Η συγκέντρωση του απομονωθέντος γενετικού υλικού (χρωμοσωμικού και πλασμιδιακού) προσδιορίσθηκε μέσω φωτομέτρησης στα 260nm. Για τη φωτομέτρηση χρησιμοποιήθηκε 1μl DNA το οποίο αραιώθηκε σε 999μl TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH=7,6). Η φωτομέτρηση έγινε με χρήση του φωτόμετρου 6105 U.V./Vis της εταιρίας JENWAY (Εικόνα 14).

Η συγκέντρωση του DNA υπολογίσθηκε βάση της σχέσης: μία μονάδα οπτικής πυκνότητας (O.D.)=DNA 50μg/ml.



Εικ. 14: Συσκευή φωτομέτρησης.





## 2.7. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ΓΙΑ ΤΟ Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) είναι μία μέθοδος της μοριακής βιολογίας μέσω της οποίας επιτυγχάνεται ο πολλαπλασιασμός/ενίσχυση μιας αλληλουχίας DNA ή RNA με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων τα οποία καλούνται Πολυμεράσες. Η μέθοδος ανακαλύφθηκε από τον Kary Mullis το 1983 στην προσπάθειά του να συνθέσει ολιγονουκλεοτίδια για ερευνητικούς σκοπούς. Η πρώτη δημοσίευση σχετικά με τη μέθοδο PCR έγινε το 1985 από τους Saiki *et al.* (140) και αφορούσε στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό του γονιδίου της β-σφαιρίνης.

Η PCR είναι μία *in vitro* μέθοδος, δηλαδή δεν απαιτεί την παρουσία ζωντανών κυττάρων για τη διεξαγωγή της. Απαραίτητη, ωστόσο, είναι η γνώση τουλάχιστον ενός μέρους της αλληλουχίας του μελετούμενου τμήματος DNA ή RNA ώστε να σχεδιασθούν τα δύο ειδικά πριμοδοτικά μόρια (primers) που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές για την αντίδραση. Το καθένα από τα νουκλεοτίδια αυτά είναι συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA ή RNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές καθορίζουν τα άκρα της αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί.

Η PCR απαιτεί τα ακόλουθα συστατικά για τη διεξαγωγή της:

- Εκμαγείο DNA ή RNA. Το μόριο του DNA ή RNA, το οποίο πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Το χρησιμοποιούμενο εκμαγείο πρέπει να είναι ικανοποιητικού μεγέθους και συγκέντρωσης ώστε να μπορεί να ενισχυθεί η περιοχή-στόχος της αντίδρασης και να μην περιέχει μόρια ή χημικές ενώσεις που μπορεί να επιδράσουν ανασταλτικά στην αντίδραση.
- Πολυμεράση. Είναι ένζυμο πολυμερισμού, δηλαδή καταλύει αντιδράσεις σύνθεσης DNA ή RNA. Η συγκέντρωση της πολυμεράσης



στην PCR κυμαίνεται μεταξύ 0,5-2,5Units, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορούν να δράσουν ανασταλτικά στην αντίδραση.

- Κατιόντα μαγνησίου. Παρέχονται με τη μορφή  $MgCl_2$  ή  $MgSO_4$ . Τα κατιόντα μαγνησίου επηρεάζουν την ενεργότητα της πολυμεράσης και σχηματίζουν σύμπλοκα με τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκεοτίδια (dNTPs), τα οποία αναγνωρίζονται από την πολυμεράση. Η συνήθης συγκέντρωση κατιόντων μαγνησίου κυμαίνεται μεταξύ 0,5-5mM.
- Δύο εκκινητές. Είναι απαραίτητοι για την έναρξη της αντιγραφής του γενετικού υλικού. Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές έχουν συνήθως μήκος 15-20bp. Η σύσταση των εκκινητών επηρεάζει τη θερμοκρασία αποδιάταξης του δίκλωνου μορίου DNA.
- Μονομερή τριφωσφορικά δεοξυριβονουκεοτίδια (dNTPs). Είναι τριφωσφορικά μόρια Αδενίνης (dATPs), Θυμίνης (dTTPs), Γουανίνης (dGTPs) και Κυτοσίνης (dCTPs). Τα μόρια αυτά θα χρησιμοποιηθούν από την Πολυμεράση για τη σύνθεση των νέων κλώνων DNA.
- Ειδικά σωληνάρια (PCR tubes).
- Θερμοκυκλοποιητής. Οι θερμοκυκλοποιητές είναι ειδικά μηχανήματα στα οποία διεξάγεται αυτόματά η PCR αντίδραση.

Η μέθοδος της PCR περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA (denaturation). Κατά το στάδιο αποδιάταξης, το δίκλωνο μόριο του DNA μετατρέπεται, λόγω θερμότητας, σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες
- Υβριδοποίηση των εκκινητών με το DNA ή RNA εκμαγείο (annealing). Σε αυτό το στάδιο υπάρχει πτώση της θερμοκρασίας, ώστε οι εκκινητές να συνδεθούν με την προς ενίσχυση μονόκλωνη αλυσίδα.
- Επιμήκυνση των εκκινητών (extension). Στο στάδιο της επιμήκυνσης των εκκινητών, η εκάστοτε Πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές βάση του κανόνα της συμπληρωματικότητας, πολυμερίζοντας τα μονομερή dNTPs.



Τα παραπάνω στάδια διεξάγονται επαναληπτικά (συνήθως 25-35 κύκλοι) και τα νεοσυντιθέμενα μόρια DNA μπορούν να λειτουργήσουν ως εκμαγεία για τη σύνθεση νέων μορίων.

Έλεγχος της πιστότητας της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης γίνεται με ηλεκτροφόρηση 10 μl των προϊόντων της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζης/ΤΑΕ 2%.

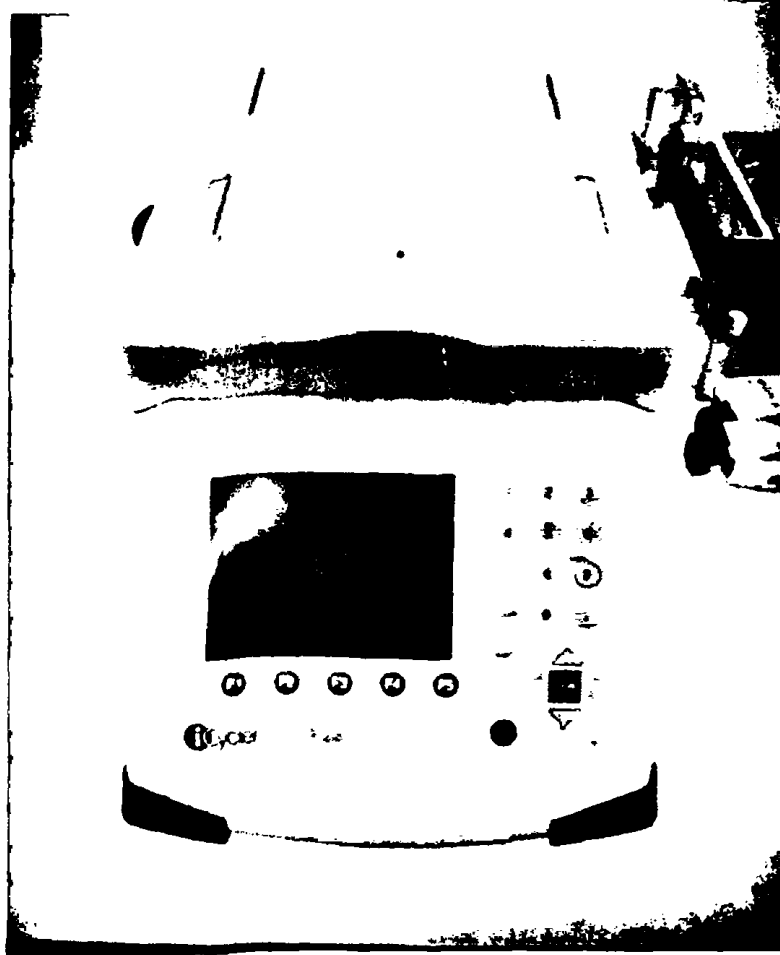
Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης για το Β-κυτταρικό υποδοχέα στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε με τη βοήθεια του IGH Gene Rearrangement Assay For Identification of B Cell Clonality της InVivoScribe Technologies. Ωστόσο, δοκιμές έγιναν και με τη χρήση των πρωτοκόλλων των Meier *et al.* (137) και των Mishima *et al.* (138).

Επιπρόσθετα, σε κάποιες από τις αντιδράσεις PCR, όπου χρησιμοποιήθηκαν τα πριμοδοτικά μόρια των MISHIMA *et al.* (138), εφαρμόστηκε και μία παραλλαγή της μεθόδου PCR, η semi-nested PCR.

Η semi-nested PCR αποτελείται από δύο στάδια: α) στο πρώτο στάδιο ενισχύεται ένα μεγάλο τμήμα DNA, το οποίο περιλαμβάνει και το επιθυμητό για ενίσχυση τμήμα, β) στο δεύτερο στάδιο χρησιμοποιείται ως εκμαγείο DNA το προϊόν της αντίδρασης από το πρώτο στάδιο. Τα πριμοδοτικά μόρια που χρησιμοποιούνται κατά το δεύτερο στάδιο της nested PCR είναι είτε και τα δύο πριμοδοτικά μόρια (nested PCR) είτε ένα από αυτά (semi-nested PCR), τα οποία είναι διαφορετικά από τα πριμοδοτικά μόρια που είχαν χρησιμοποιηθεί στο πρώτο στάδιο της αντίδρασης. Με τον τρόπο αυτό ενισχύεται εν τέλει το επιθυμητό τμήμα DNA. Η τεχνική της semi-nested PCR ή nested PCR εφαρμόζεται σε περιπτώσεις όπου παρουσιάζεται δυσκολία ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος DNA.

Ο θερμοκυκλοποιητής που χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις PCR ήταν ο iCycler της εταιρίας Biorad (Εικόνα 15).





Εικ. 15: Θερμοκυκλοποιητής iCycler.

## 2.8. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ β- ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης για το γονίδιο της β-σφαιρίνης (β-globin) εφαρμόστηκε ως τρόπος εξέτασης της ποιότητας του γενετικού υλικού που μελετήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Τα πριμοδοτικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης είναι ανάλογα αυτών που χρησιμοποιήθηκαν από τους Meier *et al.*(137). Επιτυχημένη διεξαγωγή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης οδηγεί στην ενίσχυση του γονιδίου της β-σφαιρίνης μεγέθους 356bp.

Έλεγχος της πιστότητας της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης γίνεται με ηλεκτροφόρηση 10 μl των προϊόντων της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζης/TAE 2%.

## **2.9. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ**

Η μέθοδος διαχωρισμού τμημάτων DNA, μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης, βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA φέρει αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα όταν βρεθεί σε μέσο στο οποίο εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο, να κινείται προς το θετικό πόλο.

Η πηκτή αγαρόζης παρασκευάζεται από αγαρόζη η οποία διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x (Tris Acetate EDTA) μετά από θέρμανση. Η συγκέντρωση αγαρόζης στο πηκτή είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού βάρους του DNA που μελετούμε. Το διάλυμα είναι ρευστό σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ στερεοποιείται σε χαμηλές. Λίγο πριν τη στερεοποίηση του διαλύματος, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε τελική συγκέντρωση 0.2μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ικανότητα να προσδένεται στο DNA δίνοντάς του ρόδινο χρώμα, όταν εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (Εικόνα 16).

Η αγαρόζη αποτελεί το ηλεκτρικά ουδέτερο συστατικό ενός φυσικού γραμμικού πολυσακχαρίτη, του άγαρ. Το άγαρ απομονώνεται από διάφορα είδη φυκιών και οι δομικές του μονάδες είναι μίγμα D-γαλακτόζης και 3,5-ανυδρο-L-γαλακτόζης. Η δεύτερη ομάδα από την οποία αποτελείται το άγαρ είναι η αγαροπηκτίνη η οποία είναι ηλεκτρικά φορτισμένη.

Η ηλεκτροφόρηση έχει ως εξής:

- Το κάθε δείγμα DNA αναμιγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα χρωστικής σε αναλογία όγκων 5:1 αντίστοιχα και τοποθετείται σε ξεχωριστό φρεάτιο του



πηκτής. Σε μερικά φρεάτια της πηκτής τοποθετείται το πρότυπο μοριακών βαρών (ladder DNA).

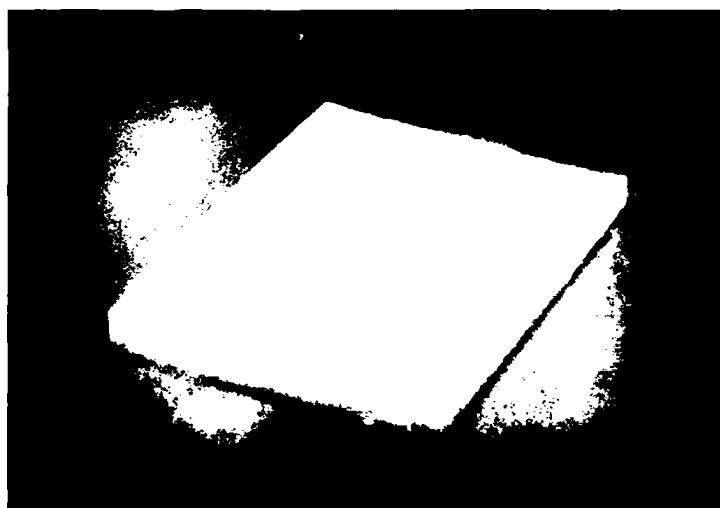
- Το πηκτή είναι βυθισμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Η τάση ηλεκτρικού ρεύματος που εφαρμόζεται είναι 1-4 volt/cm πηκτής.
- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πηκτή εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφίζεται.

Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος TAE σε συγκέντρωση 50x έχει ως εξής:

- 242gr Tris Base
- 57,1 ml Glacial acetic acid
- 100ml EDTA 0,5mM pH=8
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού έως τελικό όγκο 1L

Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος χρωστικής 10x έχει ως εξής:

- 1% SDS
- 50% Glycerol
- 0.05% Bromophenol Blue



*Εικ.16: Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης (ανακτημένο στις 1/12/2010 από τον ιστότοπο <http://sciencebiotech.net>).*

Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης έγινε με τη βοήθεια της συσκευής ηλεκτροφόρησης Horizon 11-14 (Εικόνα 17).



Εικ.17: Συσκευή ηλεκτροφόρησης Horizon 11-14.

## 2.10. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ανάκτηση θραυσμάτων DNA μετά από ηλεκτροφόρηση και ο καθαρισμός τους από την αγαρόζη έγινε με χρήση του ειδικού πακέτου της εταιρίας Macherey-Nagel και είχε ως εξής:

- Απομακρύνονται από το πηκτή αγαρόζης τα θραύσματα που αντιστοιχούν στις επιθυμητές ζώνες DNA.
- Προστίθεται διάλυμα NT σε αναλογία 200μl ανά 100mg και το δείγμα θερμαίνεται στους 50°C έως ότου διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Κατά τη διάρκεια της θέρμανσης τελείται συχνή ισχυρή ανάδευση.
- Το δείγμα φορτώνεται σε ειδική στήλη και φυγοκεντρείται για 1min στις 11000g.

- Προστίθενται 600μl διαλύματος NT3 και το δείγμα φυγοκεντρείται για 1min στις 11000g.
- Εκτελείται νέα φυγοκέντρηση για 2min στις 11000g και η ειδική στήλη που περιέχει το δείγμα μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωλήνα.
- Προστίθενται 25 μl διαλύματος έκλουσης NE προθερμασμένου στους 70°C και το δείγμα επωάζεται για 3min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για 1min στις 11000g.
- Επαναλαμβάνονται τα δύο προηγούμενα βήματα.
- Το DNA συλλέγεται σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και αποθηκεύεται στους -20°C.

Τα θραύσματα DNA που επιλέχθηκαν για καθαρισμό από αгарόζη αντιστοιχούν στα τμήματα εκείνα του DNA που ενισχύθηκαν με την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης. Οι ζώνες επιλέχθηκαν βάση του μεγέθους τους, ώστε να είναι σύμφωνες με το εκάστοτε επιθυμητό τμήμα DNA.

## **2.11. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΑΝΑΞΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΟΡΙΩΝ DNA - ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΧΗΜΙΚΩΣ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

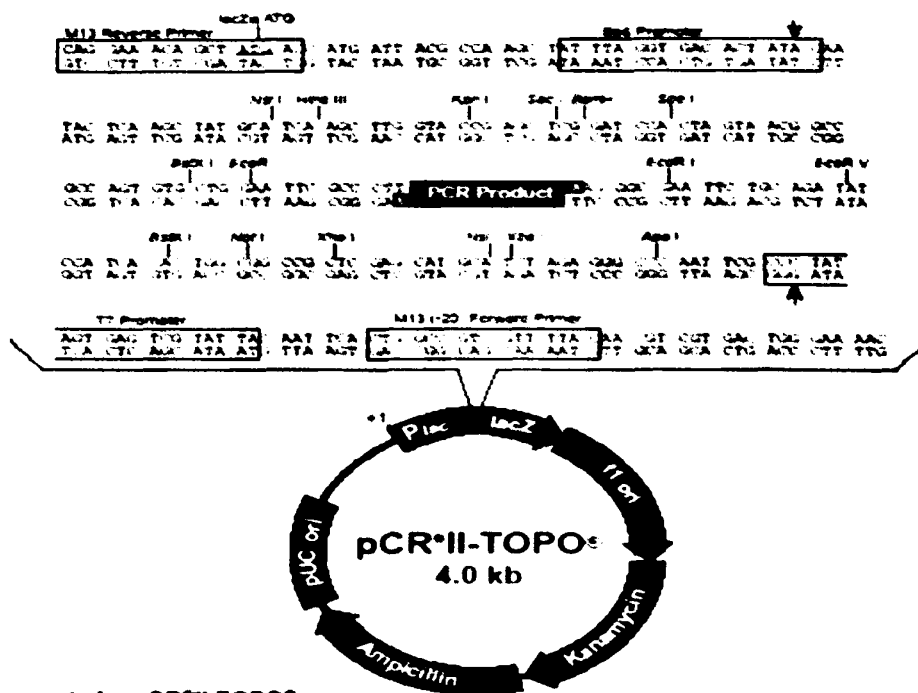
Μετά το πέρας του καθαρισμού της επιθυμητής ζώνης DNA από την αгарόζη, το DNA δεσμοποιείται στον κατάλληλο φορέα κλωνοποίησης pCRII® – TOPO® του πακέτου κλωνοποίησης και μετασχηματισμού κυττάρων TOPO TA Cloning® Kit Dual Promoter της Invitrogen (Εικόνα 18). Η δεσμοποίηση τελείται με την προσθήκη:

1. 0,5μl διαλύματος άλατος
2. 0,5μl του φορέα κλωνοποίησης
3. 1-2μl του DNA
4. Απεσταγμένο νερό έως τελικού όγκου 3μl.





Το μείγμα κλωνοποίησης επωάζεται για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Επιτυχημένη διαδικασία κλωνοποίηση οδηγεί στην κατασκευή ανασυνδυασμένων μορίων DNA που αποτελούνται από το φορέα κλωνοποίησης και το εκάστοτε επιθυμητό ένθεμα.



Comments for pCR®II-TOPO®  
3973 nucleotides

LacZα gene bases 1-589  
M13 Reverse priming site bases 205-221  
Sp6 promoter bases 239-256  
Multiple Cloning Site bases 269-383  
T7 promoter bases 406-425  
M13 (-20) Forward priming site bases 433-448  
f1 origin bases 590-1027  
Kanamycin resistance ORF bases 1361-2155  
Ampicillin resistance ORF bases 2173-3033  
pUC origin bases 3178-3851

Εικ. 18: Περιοριστικός χάρτης του φορέα κλωνοποίησης pCR®II - TOPO®.

Ο μετασχηματισμός των χημικώς επιδεκτικών κυττάρων E.coli/Mach1™ - T1<sup>R</sup> (ανθεκτικά στο βακτηριοφάγο T1) του πακέτου κλωνοποίησης και μετασχηματισμού χημικώς επιδεκτικών κυττάρων One Shot® Mach1®-T1<sup>R</sup> της εταιρίας Invitrogen έχει ως εξής:

- Σε κάθε φιαλίδιο με κύτταρα E.coli/Mach1™ - T1<sup>R</sup> προστίθενται 2μl του μίγματος κλωνοποίησης και ακολουθεί ήπια ανάδευση.



- Ακολουθώς τα κύτταρα επωάζονται για 30min σε πάγο, τοποθετούνται για 30sec στους 42°C και τέλος επανατοποθετούνται σε πάγο.
- Προστίθενται 125μl θρεπτικού μέσου SOC και ακολουθεί ήπια ανάδευση. Κατόπιν τα κύτταρα επωάζονται για 1hr στους 37°C υπό συνεχή ανακίνηση στις 200rpm.
- Τέλος επιστρώνονται 50μl των μετασχηματισμένων κυττάρων σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό μέσο LA με καναμυκίνη και X-Gal προθερμασμένα 37°C (Kan: 50μg/ml, X-Gal: 40μl, 40mg/ml).
- Τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C/ON.

Η χρήση του αντιβιοτικού καναμυκίνη καθώς και του X-Gal διευκολύνει την επιλογή των αποικιών εκείνων που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιείται φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη, ενώ το εκάστοτε ένθεμα εισάγεται σε περιοριστική θέση μεταξύ του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης και του υποκινητή του, με αποτέλεσμα να απενεργοποιείται το γονίδιο. Το X-Gal (5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοζίτης) αποτελεί χρωμογόνο υπόστρωμα για τη β-γαλακτοσιδάση, το οποίο όταν υδρολύεται σε ινδόλιο δίνει παράγωγο μπλε χρώματος. Η εισαγωγή του ενθέματος – και κατά συνέπεια η απενεργοποίηση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης – έχει ως αποτέλεσμα τη εμφάνιση αποικιών λευκού χρώματος.

## 2.12. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗΣ ΠΕΨΗΣ

Μετά το πέρας της απομόνωσης πλασμιδιακού DNA γίνεται πέψη των πλασμιδίων με το περιοριστικό ένζυμο *EcoRI*. Για την πέψη χρησιμοποιούνται:

- 100ngr/μl ήλασμιδίου,
- 1μl του ενζύμου *EcoRI*,
- 1μl Buffer H 10x,
- απεσταγμένο νερό έως τελικό όγκο 10μl.



Το μίγμα της πλασμιδιακής πέψης επωάζεται για 90min στους 37°C.

Μετά την ολοκλήρωση της πλασμιδιακής πέψης, τελείται ηλεκτροφόρηση 10μl DNA σε πηκτική αγαρόζης 1%.

Μέσω της πέψης των πλασμιδίων με το ένζυμο *EcoRI* μπορεί να ελεγχθεί η πιστότητα της δεσμοποίησης του ενθέματος με το φορέα κλωνοποίησης pCRII® – TOPO®. Εάν έχει δεσμοποιηθεί σωστά ο φορέας κλωνοποίησης με το εκάστοτε επιθυμητό ένθεμα, η πέψη με *EcoRI* θα οδηγήσει στην τομή των πλασμιδίων σε δύο τμήματα μεγέθους:

- περίπου 4kb, στο οποίο αντιστοιχεί ο φορέας κλωνοποίησης pCRII® – TOPO®
- 69-129bp ή 235-295bp ή 290-360bp, για το FR3 ή για το FR2 ή για το FR1 αντίστοιχα.

## 2.13. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΜΟΡΙΩΝ DNA (DNA SEQUENCING)

Η ανάγνωση της αλληλουχίας DNA των εκάστοτε πλασμιδίων έγινε από την εταιρία Macrogen Inc. με χρήση αναλυτών ABI 3730 XL και ABI 3700 DNA.

Για την εύρεση της αλληλουχίας των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα πριμοδοτικά μόρια:

- M13 (-20)F, το οποίο είναι συμπληρωματικό του φορέα κλωνοποίησης pCRII® – TOPO® στις θέσεις 433-448
- M13R, το οποίο είναι συμπληρωματικό του φορέα κλωνοποίησης pCRII® – TOPO® στις θέσεις 205-221.

Για καλύτερη ανάλυση των δειγμάτων, απαιτείται η αποστολή τους σε συγκέντρωση 100ng/μl σε ποσότητα 20μl/δείγμα.

Η αποστολή των αποτελεσμάτων γίνεται ηλεκτρονικά σε μορφή .pdf, .txt, .ab1, .phd.1 ή .scf αρχείων.



## 2.14. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ

Το υπολογιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της εύρεσης αλληλουχίας του DNA ήταν το MEGA έκδοση 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

Το MEGA είναι ένα υπολογιστικό εργαλείο το οποίο χρησιμεύει στην εξερεύνηση και στην ανάλυση νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών από εξελικτική σκοπιά. Επιπλέον, παρέχει στους επιστήμονες τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουν υπολογιστικές και στατιστικές μεθόδους και αλγορίθμους για την καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας και της εξέλιξης των γονιδίων και των ειδών. Η χρήση του προγράμματος MEGA από την επιστημονική κοινότητα είναι ευρεία, περιλαμβάνοντας περισσότερες από 10.000 βιβλιογραφικές αναφορές.

Η πρώτη έκδοση του (MEGA 1) αναπτύχθηκε το 1993 από τους Kumar *et al.* (141) στο Πανεπιστήμιο της Πενσυλβάνια, Η.Π.Α.. Η συγκεκριμένη έκδοση, αν και περιοριζόταν από το εμβρυϊκό στάδιο της επιστήμης της Πληροφορικής, παρείχε πολλές μεθόδους για την εκτίμηση εξελικτικών αποστάσεων από στοιχεία που προέρχονταν από νουκλεοτίδια και από αμινοξέα, τρεις διαφορετικούς τρόπους εξαγωγής φυλογένεσης και στατιστικές δοκιμές αυτών. Μια από τις πιο χρήσιμες εφαρμογές του προγράμματος MEGA 1 ήταν η μέθοδος κατασκευής φυλογενετικών δέντρων και δενδρογραμμάτων Neighbor-Joining (142) για την εξαγωγή φυλογενετικών συμπερασμάτων.

Το 2001 αναπτύχθηκε η έκδοση MEGA 2 (143), η οποία παρείχε τη δυνατότητα ανάλυσης εκτενέστερων δεδομένων και ομάδων αλληλουχιών, καθώς και περισσότερες επιλογές όσον αφορά στις στατιστικές δοκιμές. Οι εφευρέτες του, εκμεταλλευόμενοι την ανάπτυξη της Πληροφορικής, κατάφεραν να επεκτείνουν το πεδίο δράσης του MEGA 1 από την ανάλυση γονιδίων στην ανάλυση ολόκληρων γονιδίων στο MEGA 2. Στη συγκεκριμένη έκδοση περιλαμβάνονταν και οι δοκιμές αξιοπιστίας των παραγόμενων



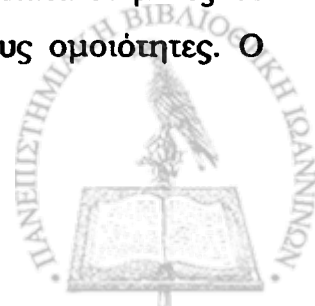
φυλογενετικών συμπερασμάτων, bootstrap και δεσμευμένης πιθανότητας (confidence probability).

Η επόμενη έκδοση MEGA 3 αναπτύχθηκε το 2004 (144) και πρόσφερε λύσεις σε θέματα επανάκτησης δεδομένων και μείωσης των ποσοστών σφάλματος κατά την αλληλούχιση τμημάτων DNA που εμφάνιζαν οι προηγούμενες εκδόσεις. Επιπλέον, πρόσφερε τη δυνατότητα εισαγωγής δεδομένων σε μορφή FASTA, καθώς και τη χρήση του αλγορίθμου CLUSTALW(145) για την αλληλούχιση πολλαπλών αλληλουχιών DNA.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε η έκδοση MEGA 4, η οποία αναπτύχθηκε το 2007 (146). Η συγκεκριμένη έκδοση παρέχει περισσότερες επιλογές όσον αφορά στην εισαγωγή των δεδομένων, στους τρόπους επεξεργασίας των αλληλουχιών DNA και πρωτεϊνών, στις μεθόδους παραγωγής φυλογενετικών δέντρων και δενδρογραμμάτων και στην εκτίμηση φυλογενετικών αποστάσεων, σε σχέση με τις παλαιότερες εκδόσεις. Επιπρόσθετα, παρέχει τη δυνατότητα χρήσης εξελιγμένων μοντέλων οπτικοποίησης των παραγόμενων αποτελεσμάτων.

Οι αλληλουχίες των πλασμιδίων εισήχθησαν στο πρόγραμμα MEGA 4 σε μορφή αρχείων .ab1. Με τη βοήθεια του προγράμματος βρέθηκαν τα δύο εξανουκλεοτίδια GAATTC (αλληλουχία την οποία αναγνωρίζει και κόβει το περιοριστικό ένζυμο *EcoRI*) και επιλέχθηκε μόνο η ενδιάμεση αλληλουχία. Κατόπιν, έγιναν συγκριτικές αντιστοιχίσεις των αλληλουχιών μέσω του αλγορίθμου CLUSTALW και κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα δενδρογράμματα (FR1, FR2, FR3) με τη μέθοδο κατασκευής Neighbor-Joining.

Περαιτέρω επεξεργασία των αλληλουχιών περιλάμβανε τη βιβλιογραφική αναζήτηση παρόμοιων ανοσοσφαιρινών μέσω του αλγορίθμου BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Ο αλγόριθμος BLAST δίνει τη δυνατότητα στους επιστήμονες να συγκρίνουν μία άγνωστη νουκλεοτιδική ή πρωτεϊνική αλληλουχία με αλληλουχίες γνωστές και ήδη κατατεθειμένες σε ειδική βάση δεδομένων και να αναγνωρίσει τις μεταξύ τους ομοιότητες. Ο



συγκεκριμένος αλγόριθμος σχεδιάστηκε το 1990 από τους Altschul *et al.* (147) και διατίθεται δωρεάν μέσω της ιστοσελίδας της NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Κατόπιν, μέσω του αλγορίθμου CLUSTALW έγινε συγκριτική αντιστοίχιση των ήδη κατατεθειμένων αλληλουχιών με τις αλληλουχίες που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή και με τη μέθοδο κατασκευής Neighbor-Joining του προγράμματος MEGA 4 κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα δενδρογράμματα (FR1, FR2, FR3).



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή εξετάστηκαν 17 περιστατικά από ασθενείς του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Τα 16 από αυτά τα δείγματα είχαν μονιμοποιηθεί σε φορμόλη και είχαν εγκολληθεί σε παραφίνη (FFPE), ενώ ένα ήταν νωπό δείγμα βαθιάς κατάψυξης. Το νωπό δείγμα βαθιάς κατάψυξης, καθώς και 13 από τα 16 δείγματα FFPE είχαν διαγνωσθεί ως διάχυτα λεμφώματα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα. Τα υπόλοιπα τρία δείγματα FFPE είχαν διαγνωσθεί ως χρόνια ενεργός γαστρίτιδα, floral ποικιλία οζώδους/θυλακιώδους λεμφώματος και δέρμα μετά από τσίμπημα εντόμου, αντίστοιχα.

### 1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA

Η απομόνωση του χρωμοσωμικού DNA έγινε με χρήση του πακέτου απομόνωσης Genomic Tissue NucleoSpin® Tissue της εταιρίας Macherey – Nagel. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο απομόνωσης κρίθηκε ικανοποιητικό αφού οδηγούσε α) στην απομόνωση DNA σε υψηλή συγκέντρωση, όπως απέδειξε η φωτομέτρηση του απομονωθέντος γενετικού υλικού στα 260nm και β) στην απομόνωση μεγαλομοριακού DNA, όπως απέδειξε η ηλεκτροφόρηση του απομονωθέντος γενετικού υλικού σε πηκτή αгарόζης.

Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψιν ότι το απομονωθέν γενετικό υλικό θα χρησιμοποιούνταν σε αντιδράσεις PCR, έγιναν κάποιες επιπλέον δοκιμές. Οι δοκιμές αυτές αφορούσαν στη βελτιστοποίηση της μεθόδου αποπαραφίνωσης, στον επιπλέον καθαρισμό και στην καταβύθιση του απομονωθέντος γενετικού υλικού και στην ομογενοποίηση του φρέσκου ιστού.



## 1.1. ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗΣ

Όπως έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο «Υλικά και μέθοδοι», η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης είναι μία ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδος, η οποία απαιτεί την ύπαρξη ενός εκμαγείου γενετικού υλικού ικανοποιητικού μεγέθους, συγκέντρωσης και καθαρότητας για να λειτουργήσει.

Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι οι περισσότερες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη μονιμοποίηση ενός ιστού πριν τον εγκλεισμό του σε παραφίνη οδηγούν σε διάσπαση του γενετικού υλικού σε μικρότερα τμήματα, γεγονός το οποίο περιορίζει σημαντικά το μέγεθος των περιοχών-στόχων που μπορούν να ενισχυθούν μέσω της PCR(139). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η μονιμοποίηση ενός ιστού σε φορμόλη προκαλεί λιγότερο εκτεταμένη διάσπαση του γενετικού υλικού και έχει τα καλύτερα αποτελέσματα σε αντιδράσεις PCR εφόσον η περιοχή-στόχος είναι σχετικά μικρού μεγέθους (<400bp)(139, 148-153). Για τους ανωτέρω λόγους, στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν ιστοί οι οποίοι είχαν μονιμοποιηθεί σε φορμόλη πριν τον εγκλεισμό τους σε παραφίνη.

Μία δεύτερη παράμετρος που λήφθηκε υπόψιν ήταν ότι η παραφίνη δρα ανασταλτικά σε αντιδράσεις PCR(148, 154). Οι δοκιμές οι οποίες έγιναν κατά την παρούσα διδακτορική διατριβή αποσκοπούσαν στην απομάκρυνση της περίσσειας παραφίνης διατηρώντας άθικτο το μέγεθος του απομονωθέντος DNA. Οι δοκιμές περιλάμβαναν δύο πεδία:

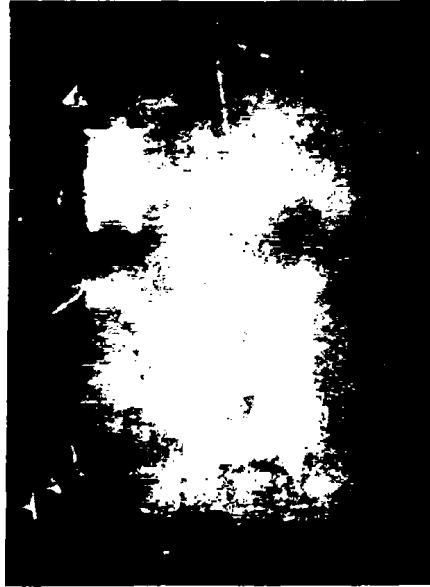
### 1.1.1. ΤΟΜΕΣ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ ΤΩΝ 20 $\mu$ m ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΜΩΝ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ ΤΩΝ 10 $\mu$ m

Δοκιμές απέδειξαν ότι όταν το πρωτόκολλο αποπαραφίνωσης εφαρμοζόταν σε τομές των 10 $\mu$ m οδηγούσε σε απομάκρυνση μεγαλύτερου

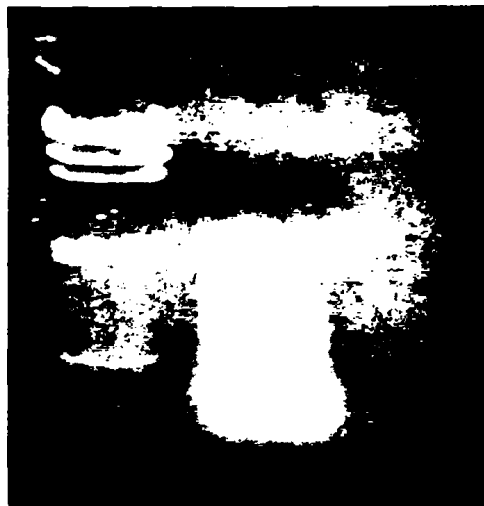




ποσοστού παραφίνης από ό,τι στις τομές των 20 $\mu$ m και κατά συνέπεια σε απομόνωση DNA καλύτερης ποιότητας (Εικόνες 19 και 20).



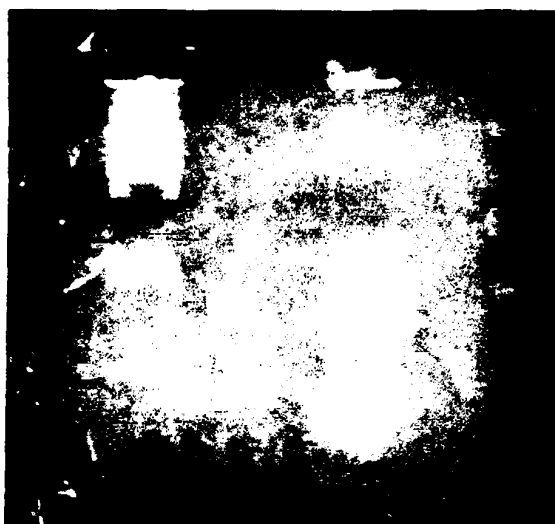
Εικ. 19: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ λ DNA/Hind III Ladder  
Διαδρομή 2: Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αγαρόζη 0,7% μετά από αποπαραφίνωση τομών των 20 $\mu$ m.



Εικ. 20: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ λ DNA/Hind III Ladder  
Διαδρομή 2: Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αγαρόζη 0,7% μετά από αποπαραφίνωση τομών των 40 $\mu$ m.

## 1.1.2. ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΘΕΡΜΑΣΜΕΝΗΣ ΞΥΛΟΛΗΣ ΚΑΤΑ ΤΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗΣ

Η χρήση ξυλόλης προθερμασμένης στους 40°C κατά τη διαδικασία αποπαραφίνωσης, φάνηκε μετά από δοκιμές να ευνοεί την απομάκρυνση μεγαλύτερου ποσοστού παραφίνης, σε σχέση με τη χρήση μη προθερμασμένης ξυλόλης (Εικόνες 21 και 22).



ικ. 21: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ λ DNA/Hind III Ladder  
Διαδρομή 2: Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αγαρόζης 0,7% μετά από αποπαραφίνωση χωρίς τη χρήση προθερμασμένης ξυλόλης



ικ. 22: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ λ DNA/Hind III Ladder  
Διαδρομή 2: Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αγαρόζης 0,7% μετά από αποπαραφίνωση με χρήση προθερμασμένης ξυλόλης (40°C).

## 1.2. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΜΕ ΤΟ ΠΑΚΕΤΟ ΥΛΙΚΩΝ WIZARD® DNA CLEAN-UP SYSTEM

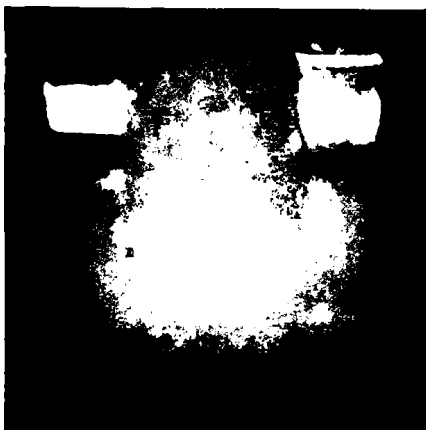
Για τον επιπλέον καθαρισμό του απομονωθέντος γενετικού υλικού χρησιμοποιήθηκε το πακέτο υλικών Wizard® DNA Clean-Up System της εταιρίας Promega. Η διαδικασία του επιπλέον καθαρισμού αποσκοπούσε στην απομάκρυνση ακόμα μεγαλύτερου ποσοστού παραφίνης που θα μπορούσε να δράσει ανασταλτικά στην Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.

Δοκιμές απέδειξαν ότι η διαδικασία του επιπλέον καθαρισμού είχε σοβαρές αρνητικές επιπτώσεις στη συγκέντρωση του απομονωθέντος γενετικού υλικού, ενώ δε φάνηκε να συμβάλλει ουσιαστικά στην απομάκρυνση της περίσσειας παραφίνης (Εικόνες 23 και 24).



Εικ. 23: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών  
TrackIt™ λ DNA/Hind III Ladder

Διαδρομή 2: Ηλεκτροφόρηση DNA σε  
πηκτική αгарόζης 0,7% χωρίς επιπλέον καθαρισμό.



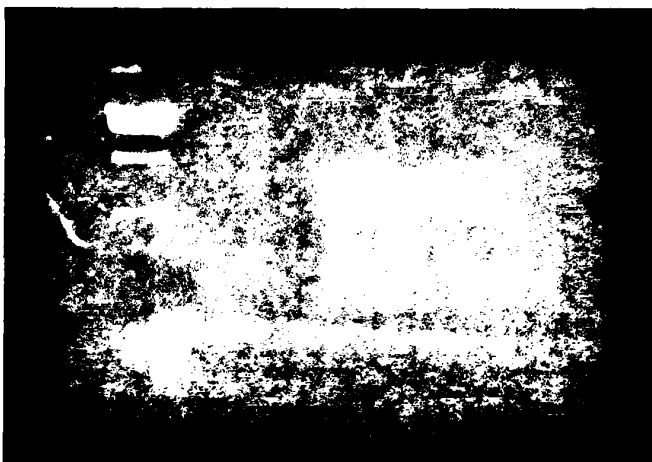
Εικ. 24: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών  
TrackIt™ λ DNA/Hind III Ladder

Διαδρομή 2: Ηλεκτροφόρηση DNA σε  
πηκτική αгарόζης 0,7% μετά από επιπλέον καθαρισμό.

### 1.3. ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Η τεχνική της καταβύθισης του DNA χρησιμοποιήθηκε με απώτερο σκοπό την απομάκρυνση ανεπιθύμητων μορίων από το γενετικό υλικό που απομονώθηκε με το πακέτο υλικών Genomic Tissue NucleoSpin® Tissue της εταιρίας Macherey –Nagel.

Δοκιμές που έγιναν με αντιδράσεις PCR χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο DNA πριν και μετά την καταβύθιση δεν έδειξαν να διαδραματίζουν κάποιον ρόλο στην επιτυχημένη διαξαγωγή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Εικόνα 25).



*Εικ. 25: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ λ DNA/Hind III Ladder  
Διαδρομή 2: Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αгарόζης 0,7% μετά από καταβύθιση.*

*Διαδρομή 3: Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αгарόζης 0,7% χωρίς καταβύθιση*

### 1.4. ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΦΡΕΣΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Η τεχνική της ομογενοποίησης χρησιμοποιήθηκε μόνο στην περίπτωση του φρέσκου ιστού και είχε ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του ιστού σε μικρότερα κομμάτια. Η τεχνική αυτή αποσκοπούσε στην αύξηση του αριθμού των κυττάρων που θα λύονταν μέσω της μετέπειτα επώασης με

πρωτεΐνάση K και διαλύματος T1 (πακέτο απομόνωσης χρωμοσωμικού DNA της Macherey-Nagel). Στόχος των εν λόγω δοκιμών ήταν η αύξηση της ποσότητας του γενετικού υλικού που θα απομονώνονταν μετέπειτα με το πακέτο υλικών Genomic Tissue NucleoSpin® Tissue της εταιρίας Macherey-Nagel.

Η ομογενοποίηση του φρέσκου ιστού έγινε με τη συσκευή Mini-Beadbeater και η σύγκριση της ποσότητας του γενετικού υλικού που απομονώθηκε με και χωρίς ομογενοποίηση έγινε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτική αгарόζης. Μέσω της ηλεκτροφόρησης, διαπιστώθηκε ότι η ομογενοποίηση του φρέσκου ιστού συμβάλλει θετικά στην αύξηση της ποσότητας του DNA που απομονώνεται (Εικόνα 26).



Εικ. 26: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ λ DNA/Hind III Ladder  
Διαδρομή 2: Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αгарόζης 0,7% μετά από ομογενοποίηση του φρέσκου ιστού.  
Διαδρομή 3: Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αгарόζης 0,7% χωρίς ομογενοποίηση του φρέσκου ιστού.

Το συμπέρασμα της ηλεκτροφόρησης επιβεβαιώθηκε και με φωτομέτρηση του εκάστοτε απομονωθέντος γενετικού υλικού στα 260nm.

ΔΕΙΓΜΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ngr/μl)
ΧΩΡΙΣ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ	300
ΜΕ ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ	870



## 2. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης για τη β-σφαιρίνη (β-globin) πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον έλεγχο της ποιότητας του απομονωθέντος γενετικού υλικού και για να εξακριβωθεί εάν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε αντιδράσεις PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα.

Οι συνθήκες της αντίδρασης είχαν ως εξής:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	
	A	B
DNA	200ng/rxn	200ng/ rxn
Buffer 10x	1x	1x
MgSO <sub>4</sub> (50mM)	1mM	1mM
Primer F	3pmol/rxn	6pmol/rxn
Primer R	3pmol/rxn	6pmol/rxn
dNTPs (2,5mM)	0,2mM	0,2mM
Platinum® Pfx DNA Polymerase	7,5U/rxn	7,5U/rxn

Οι κύκλοι της αντίδρασης ήταν οι ακόλουθοι:

1. 95°C για 5min,
2. 95°C για 1min,
3. 55°C για 1min,
4. 72°C για 1min,
5. Επανάληψη των σταδίων 2-4 άλλες 35 φορές
6. 72°C για 20min

Επιτυχημένη διεξαγωγή της αντίδρασης οδηγεί στην ενίσχυση του γονιδίου της β-σφαιρίνης μεγέθους 356bp (Εικόνα 27).





*Εικ. 27: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ 100bp DNA Ladder  
Διαδρομές 2-5: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για τη β-σφαιρίνη σε πηκτική  
αγαρόζης 2%.*



### 3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ (BCR)

Για την ανάλυση κλωνικότητας του Β-κυτταρικού υποδοχέα, έγιναν αντιδράσεις PCR με χρήση τριών διαφορετικών ομάδων πριμοδοτικών μορίων:

#### 3.1 ΠΡΙΜΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ (PRIMERS) ΚΑΤΑ MEIER *et al.*

Ο συνδυασμός των πριμοδοτικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

F PRIMER	R PRIMER	ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟ ΜΕΓΕΘΟΣ (bp)	F PRIMER	R PRIMER	ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟ ΜΕΓΕΘΟΣ (bp)
FR1-A/B	JOIN A	300-400	FR1-V2	JOIN A	300-400
	JOIN B	300-400		JOIN B	300-400
	JOIN C	300-400		JOIN C	300-400
FR1-C	JOIN A	300-400	FR3A	JOIN A	70-140
	JOIN B	300-400		JOIN B	70-140
	JOIN C	300-400		JOIN C	70-140
FR1-V4	JOIN A	300-400	FR3B	JOIN A	70-140
	JOIN B	300-400		JOIN B	70-140
	JOIN C	300-400		JOIN C	70-140
FR1-V-1/7	JOIN A	300-400			
	JOIN B	300-400			
	JOIN C	300-400			



### 3.1.1 ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ Platinum® Pfx DNA Polymerase

Στις δοκιμές που έγιναν με χρήση της Platinum® Pfx DNA πολυμεράσης, εξετάστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της PCR όσον αφορά στη συγκέντρωση του ενζύμου και στην παρουσία του ειδικού ενισχυτικού διαλύματος (Enhancer Solution) του ενζύμου. Επιπλέον, εξετάστηκε η συγκέντρωση των πριμοδοτικών μορίων κατά την αντίδραση.

#### Α) Δοκιμές με διάφορα Units της πολυμεράσης

Οι παρούσες δοκιμές έγιναν με τον ακόλουθο τρόπο:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ			
	Α	Β	Γ	Δ
DNA	200ng/rxn	200ng/rxn	200ng/rxn	200ng/rxn
Buffer 10x	1x	1x	1x	1x
MgSO <sub>4</sub> (50mM)	1mM	1mM	1mM	1mM
Primer mix*				
dNTPs (2,5mM)	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM
<b>Platinum® Pfx DNA Polymerase</b>	<b>1,75U/rxn</b>	<b>2,5U/rxn</b>	<b>5U/rxn</b>	<b>7,5U/rxn</b>

Οι κύκλοι της αντίδρασης είχαν ως εξής:

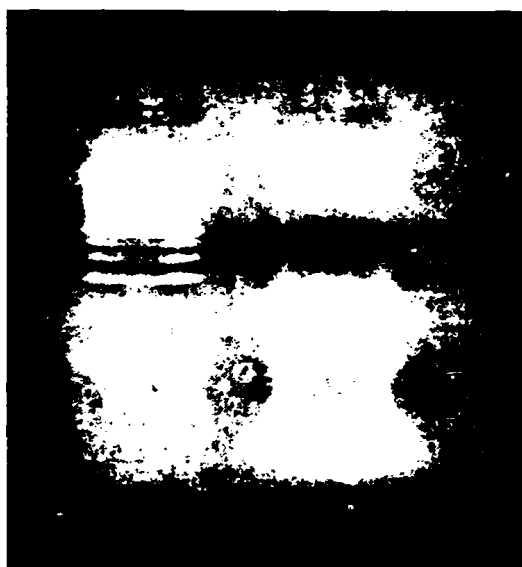
1. 95°C για 5min,
2. 95°C για 1min,
3. 55°C για 1min,
4. 72°C για 1min,
5. Επανάληψη των σταδίων 2-4 άλλες 35 φορές
6. 72°C για 20min



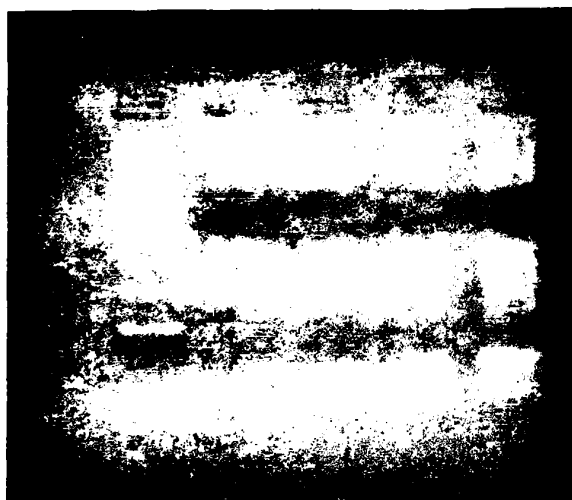
Η σύσταση του μίγματος πριμοδοτικών μορίων (primer mix)\* που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ακόλουθη:

ΟΝΟΜΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (pmol/γκnl)
FR1-A/B	5
FR1-C	2
FR1-V4	2
FR1-V-1/7	2
FR1-V2	2
FR3A	1,5
FR3B	1,5
JOIN A	8
JOIN B	2
JOIN C	2

Οι ανωτέρω δοκιμές οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η χρήση 1,75Units της πολυμεράσης Platinum® Pfx DNA με ταυτόχρονη χρήση μίγματος πριμοδοτικών μορίων, έχει ως αποτέλεσμα την επιτυχημένη ενίσχυση του Β-κυτταρικού υποδοχέα (Εικόνες 28 και 29).



Εικ. 28: Διαδρομή 1: Προϊόντο μοριακών βαρών TrackIt™ 100bp DNA Ladder  
Διαδρομή 2: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα με 1,75U/γκnl πολυμεράσης σε πηκτική αгарόζης 2% (A).



**Εικ. 29:** Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ 100bp DNA Ladder  
 Διαδρομή 2: Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης 2%.  
 Διαδρομή 3: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα με 2,5U/rxn πολυμεράσης σε πηκτή αγαρόζης 2% (Β).  
 Διαδρομή 4: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα με 5U/rxn πολυμεράσης σε πηκτή αγαρόζης 2% (Γ).  
 Διαδρομή 5: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα με 7,5U/rxn πολυμεράσης σε πηκτή αγαρόζης 2% (Δ).

### **Β) Δοκιμές παρουσία ή μη του Enhancer Solution**

Οι δοκιμές σχετικά με τη χρησιμότητα του Enhancer Solution έγιναν με τον ακόλουθο τρόπο:

<b>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ</b>	<b>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</b>			
	<b>Α</b>	<b>Β</b>	<b>Γ</b>	<b>Δ</b>
DNA	200ng/rxn	200ng/rxn	200ng/rxn	200ng/rxn
Buffer 10x	1x	1x	1x	1x
MgSO <sub>4</sub> (50mM)	1mM	1mM	1mM	1mM
Primer mix*				
dNTPs (2,5mM)	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM
<b>Enhancer Solution</b>	<b>5μl</b>	<b>5μl</b>	-	-
Platinum® Pfx DNA Polymerase	7,5U/rxn	2,5U/rxn	7,5U/rxn	2,5U/rxn



Οι κύκλοι της αντίδρασης είχαν ως εξής:

1. 95°C για 5min,
2. 95°C για 40sec,
3. 55°C για 40sec,
4. 72°C για 1min,
5. Επανάληψη των σταδίων 2-4 άλλες 35 φορές
6. 72°C για 20min

Η σύσταση του μίγματος πριμοδοτικών μορίων (primer mix)\* που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ακόλουθη:

ΟΝΟΜΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (pmol/rxn)
FR1-A/B	5
FR1-C	2
FR1-V4	2
FR1-V-1/7	2
FR1-V2	2
FR3A	1,5
FR3B	1,5
JOIN A	8
JOIN B	2
JOIN C	2

Οι δοκιμές οι οποίες έγιναν για να εξεταστεί η χρησιμότητα του διαλύματος ενίσχυσης (Enhancer Solution) της πολυμεράσης Platinum® Pfx DNA, απέδειξαν ότι το συγκεκριμένο διάλυμα δε συμβάλλει στην επιτυχημένη διεξαγωγή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Εικόνα 30).



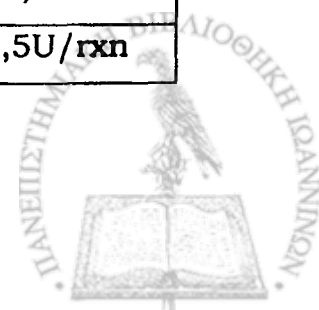


Εικ. 30: Διαδρομή 1,3,5,7: Πρότυπο μοριακών βαρών *TrackIt<sup>SM</sup> 100bp DNA Ladder*  
 Διαδρομή 2: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα με 7,5U/rxn πολυμεράσης και *enhancer solution* σε πηκτή αгарόζης 2% (Α).  
 Διαδρομή 4: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα με 2,5U/rxn πολυμεράσης και *enhancer solution* σε πηκτή αгарόζης 2% (Β).  
 Διαδρομή 6: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα με 7,5U/rxn πολυμεράσης χωρίς *enhancer solution* σε πηκτή αгарόζης 2% (Γ).  
 Διαδρομή 8: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα με 2,5U/rxn πολυμεράσης χωρίς *enhancer solution* σε πηκτή αгарόζης 2% (Δ).

### Γ) Δοκιμές σχετικά με τη συγκέντρωση των πριμοδοτικών μορίων

Στις συγκεκριμένες δοκιμές εξετάστηκε η πιθανότητα η λανθασμένη συγκέντρωση των πριμοδοτικών μορίων να δρα ανασταλτικά κατά την αντίδραση. Για το λόγο αυτό έγινε η παρακάτω δοκιμή:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	
	A	B
DNA	200ng/rxn	200ng/rxn
Buffer 10x	1x	1x
MgSO <sub>4</sub> (50mM)	1mM	1mM
<b>Primer F</b>	<b>0,5pmol/rxn</b>	<b>0,1pmol/rxn</b>
<b>Primer R</b>	<b>0,5pmol/rxn</b>	<b>0,1pmol/rxn</b>
dNTPs (2,5mM)	0,2mM	0,2mM
Platinum® Pfx DNA Polymerase	2,5U/rxn	2,5U/rxn



Οι κύκλοι της αντίδρασης είχαν ως εξής:

1. 95°C για 5min,
2. 95°C για 40sec,
3. 55°C για 40sec,
4. 72°C για 1min,
5. Επανάληψη των σταδίων 2-4 άλλες 35 φορές
6. 72°C για 20min

Σύμφωνα με τις ανωτέρω δοκιμές, η αντίδραση PCR αποδίδει καλύτερα αποτελέσματα όταν χρησιμοποιούνται τα πριμοδοτικά μόρια σε συγκέντρωση 0,5pmol/rxn σε σύγκριση με τη συγκέντρωση των 0,1pmol/rxn (Εικόνα 31).



*Εικ. 31: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ 100bp DNA Ladder  
Διαδρομή 2,4: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα  
με συγκέντρωση πριμοδοτικών μορίων 0,5pmol/rxn σε πηκτική αγαρόζη 2% (A).  
Διαδρομή 3,5: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα  
με συγκέντρωση πριμοδοτικών μορίων 0,1pmol/rxn σε πηκτική αγαρόζη 2% (B).*

### Δ) Δοκιμές σχετικά με τη συγκέντρωση των $Mg^{2+}$

Επιπλέον δοκιμές έγιναν ώστε να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση των κατιόντων  $Mg^{2+}$  για την καλύτερη διεξαγωγή των αντιδράσεων PCR. Οι συνθήκες που ακολουθήθηκαν ήταν οι ακόλουθες:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	
	A	B
DNA	200ng/rxn	200ng/rxn
Buffer 10x	1x	1x
<b>MgSO<sub>4</sub> (50mM)</b>	<b>1mM</b>	<b>2mM</b>
Primer F	0,5pmol/rxn	0,5pmol/rxn
Primer R	0,5pmol/rxn	0,5pmol/rxn
dNTPs (2,5mM)	0,2mM	0,2mM
Platinum® Pfx DNA Polymerase	1,75U/rxn	1,75U/rxn

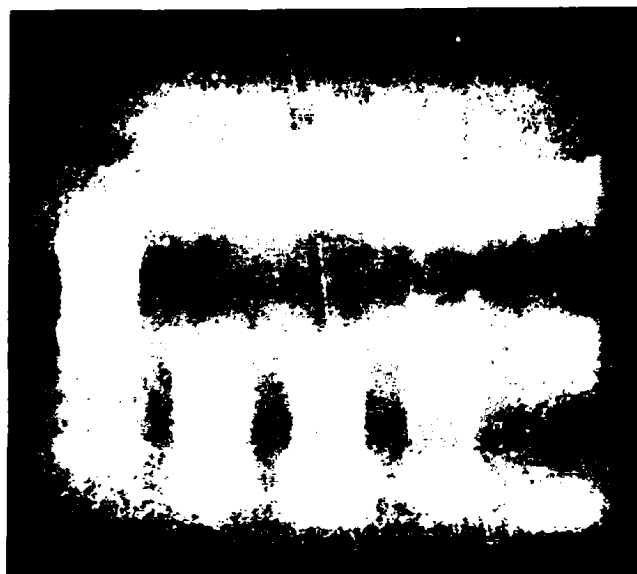
Οι κύκλοι της αντίδρασης είχαν ως εξής:

1. 95°C για 5min,
2. 95°C για 30sec,
3. 55°C για 30sec,
4. 72°C για 1min,
5. Επανάληψη των σταδίων 2-4 άλλες 39 φορές
6. 72°C για 20min

Οι παραπάνω δοκιμές απέδειξαν ότι η βέλτιστη συγκέντρωση του  $MgSO_4$  που παρέχει τα απαραίτητα κατιόντα  $Mg^{2+}$  για την PCR είναι 1mM (Εικόνα 32).







Εικ. 32: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ 100bp DNA Ladder  
 Διαδρομή 2,4: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα με συγκέντρωση  $MgSO_4$  1mM σε πηκτή αγαρόζης 2% (Α).  
 Διαδρομή 3,5: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα με συγκέντρωση  $MgSO_4$  1mM σε πηκτή αγαρόζης 2% (Β).

### Ε) Βέλτιστες συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης

Μετά από εκτεταμένες δοκιμές, επιλέχθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της PCR για την ενίσχυση του Β-κυτταρικού υποδοχέα οι οποίες είχαν ως εξής:

ΑΝΤΙΑΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
DNA	200ng/rxn
Buffer 10x	1x
$MgSO_4$ (50mM)	1mM
Primer mix	0,5pmol/rxn
dNTPs (2,5mM)	0,2mM
Platinum® Pfx DNA Polymerase	1,75U/rxn

Οι κύκλοι της αντίδρασης ήταν οι ακόλουθοι:

1. 95°C για 5min,
2. 95°C για 40sec,
3. 55°C για 40sec,
4. 72°C για 1min,
5. Επανάληψη των σταδίων 2-4 άλλες 35 φορές
6. 72°C για 20min

Οι δοκιμές (Εικόνα 33) που έγιναν για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για την ενίσχυση του Β-κυτταρικού υποδοχέα με χρήση των πριμοδοτικών μορίων των Meier *et al.* κατέληξαν στα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Η πολυμεράση Platinum® Pfx DNA φάνηκε να ενισχύει με επιτυχία το Β-κυτταρικό υποδοχέα.
2. Η πολυμεράση Platinum® Pfx DNA φάνηκε να οδηγεί σε επιτυχημένη ενίσχυση του Β-κυτταρικού υποδοχέα, όταν χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1,75Units/αντίδραση.
3. Για τη βέλτιστη διεξαγωγή των πειραμάτων PCR θα πρέπει να χρησιμοποιείται μίγμα πριμοδοτικών μορίων σε συγκέντρωση 0,5 $\mu$ mol/αντίδραση και η συγκέντρωση του MgSO<sub>4</sub> σε κάθε αντίδραση θα πρέπει να είναι 1mM.





Εικ. 33: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ 100bp DNA Ladder.  
 Διαδρομή 2-7: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα  
 υπό βέλτιστες συνθήκες σε πηκτή αγαρόζης 2%.

### 3.1.2 ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ Platinum® Taq DNA Polymerase

Οι δοκιμές που έγιναν με την Platinum® Taq DNA είχαν ως εξής:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
DNA	200ng/rxn
Buffer 10x	1x
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1mM
Primer mix*	
dNTPs (2,5mM)	0,2mM
Platinum® Taq DNA Polymerase	7,5U/rxn

Οι κύκλοι της αντίδρασης είχαν ως εξής:

1. 95°C για 5min,
2. 95°C για 40sec,
3. 55°C για 40sec,

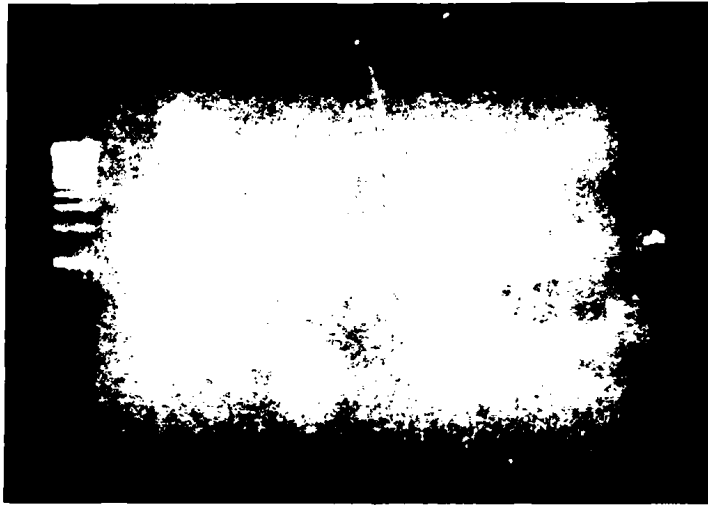
4. 72°C για 1min,
5. Επανάληψη των σταδίων 2-4 άλλες 35 φορές
6. 72°C για 20min

Η σύσταση του μίγματος πριμοδοτικών μορίων (primer mix)\* που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ακόλουθη:

ΟΝΟΜΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (pmol/rxn)
FR1-A/B	5
FR1-C	2
FR1-V4	2
FR1-V-1/7	2
FR1-V2	2
FR3A	1,5
FR3B	1,5
JOIN A	8
JOIN B	2
JOIN C	2

Οι δοκιμές οι οποίες έγιναν για την ενίσχυση του Β-κυτταρικού υποδοχέα με χρήση της πολυμεράσης Platinum® Taq DNA και των πριμοδοτικών μορίων των Meier *et al.* δεν οδήγησαν σε επιτυχημένη διεξαγωγή των αντιδράσεων PCR (Εικόνα 34).





Εικ. 34: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών *TrackIt™ 100bp DNA Ladder*.  
 Διαδρομή 2-6: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα με χρήση της *Platinum® Taq DNA* πολυμεράσης σε πηκτή αгарόζης 2%.

### 3.2 ΠΡΙΜΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ (PRIMERS) ΚΑΤΑ MISHIMA *et al.*

Ο συνδυασμός των πριμοδοτικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τους *Mishima et al.* περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

<b>F PRIMER</b>	<b>R PRIMER</b>	<b>ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟ ΜΕΓΕΘΟΣ (bp)</b>
#1541 (FR3)	#1544 (JH)	100-120
#1542 (FR3A)	#1545 (LJH)	100-120
	#1546 (VLJH)	100-120
#1543 (FR2)	#1545 (LJH)	240
	#1546 (VLJH)	240

### 3.2.1 ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης για το Β-κυτταρικό υποδοχέα έγινε κάτω από τις ακόλουθες συνθήκες:

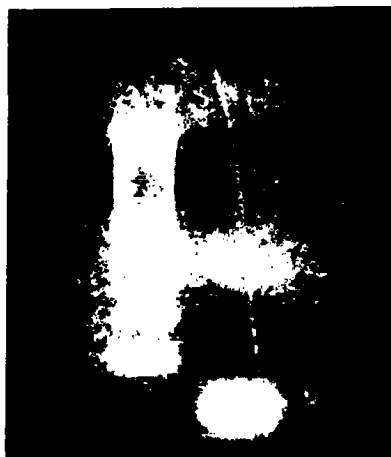
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
DNA	200ng/rxn
Buffer 10x	1x
MgSO <sub>4</sub> (50mM)	4mM
Primer F	50mM
Primer R	50mM
dNTPs (2,5mM)	0,2mM
Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity	10U/rxn

Οι κύκλοι της αντίδρασης είχαν ως εξής:

1. 95°C για 5min,
2. 94°C για 30sec,
3. 51°C για 30sec,
4. 72°C για 30sec
5. Επανάληψη των σταδίων 2-4 άλλες 29 φορές
6. 72°C για 20min

Οι δοκιμές οι οποίες έγιναν για την ενίσχυση του Β-κυτταρικού υποδοχέα με χρήση της πολυμεράσης Platinum® Taq DNA και των πριμοδοτικών μορίων των Mishima *et al.* δεν οδήγησαν σε επιτυχημένη διεξαγωγή των αντιδράσεων PCR (Εικόνα 35).





Εικ. 35: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ 100bp DNA Ladder.  
Διαδρομή 2,3: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα με χρήση της Platinum® Taq DNA High Fidelity πολυμεράσης σε πηκτική αгарόζης 2%.

### **3.2.2 ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ Platinum® Pfx DNA Polymerase**

Η πολυμεράση Platinum® Pfx χρησιμοποιήθηκε σε μεγάλο αριθμό δοκιμαστικών PCR με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών και συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων ώστε να επιτευχθεί η ενίσχυση των εκάστοτε επιθυμητών τμημάτων DNA. Κάποιες από αυτές τις δοκιμές περιλάμβαναν και μια παραλλαγή της μεθόδου PCR, την semi-nested PCR.

#### **A) Δοκιμές PCR με διαφορετικές θερμοκρασίες και αριθμούς κύκλων κατά την PCR.**

Οι δοκιμές που τελέσθηκαν κατά τις αντιδράσεις PCR με τα πριμοδοτικά μόρια των Mishima *et al.* περιλάμβαναν ως επί το πλείστον την επανάληψη της αντίδρασης με διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκίνητων με το DNA εκμαγείο, ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της PCR.



Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα:

<b>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ</b>	<b>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</b>
DNA	380ng/rxn
Buffer 10x	1x
MgSO <sub>4</sub> (50mM)	4mM
Primer F	50mM
Primer R	50mM
dNTPs (2,5mM)	0,2mM
Platinum® Pfx DNA Polymerase	1,75U/rxn

Οι κύκλοι της αντίδρασης είχαν ως εξής:

<b>ΣΤΑΔΙΟ</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>Γ</b>	<b>Δ</b>	<b>Ε</b>	<b>ΣΤ</b>	<b>Z</b>
ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ	94°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	94°C
ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗΣ	94°C	95°C	95°C	94°C	94°C	94°C	94°C
ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ	51°C	51°C	53°C	56°C	56°C	66°C	66°C
ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗΣ	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C
ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΩΝ	40	36	36	30	40	35	35

Οι δοκιμές οι οποίες έγιναν για την ενίσχυση του Β-κυτταρικού υποδοχέα με χρήση της πολυμεράσης Platinum® Pfx DNA και των πριμοδοτικών μορίων των Mishima *et al.*, αν και έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα υπό τις συνθήκες Β (θερμοκρασία ενεργοποίησης: 95°C, θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C, θερμοκρασία υβριδοποίησης: 51°C), δεν απέδωσαν όταν χρησιμοποιήθηκαν σε επαναληπτικές αντιδράσεις PCR (Εικόνες 36-42).



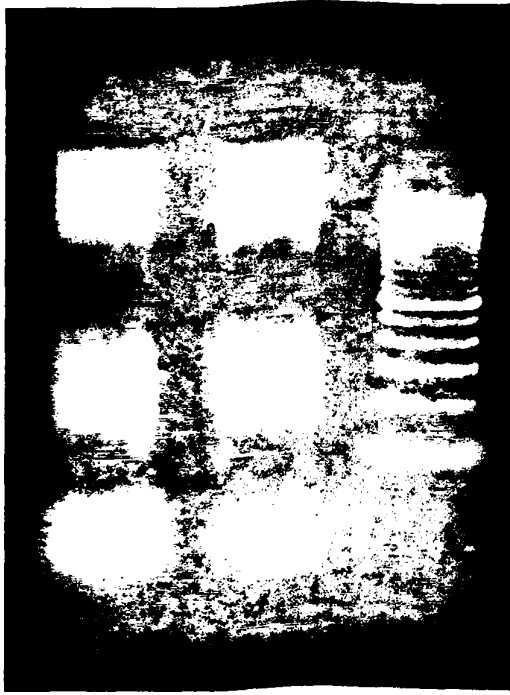




*Εικ. 36: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ 100bp DNA Ladder.  
Διαδρομή 2: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα σε  
πηκτική αγαρόζης 2% (Α).*



*Εικ. 37: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ 100bp DNA Ladder.  
Διαδρομή 2: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα σε  
πηκτική αγαρόζης 2% (Β).*



Εικ. 38: Διαδρομές 1,2: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα σε 2% (Γ).  
 Διαδρομή 3: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ 100bp DNA Ladder.

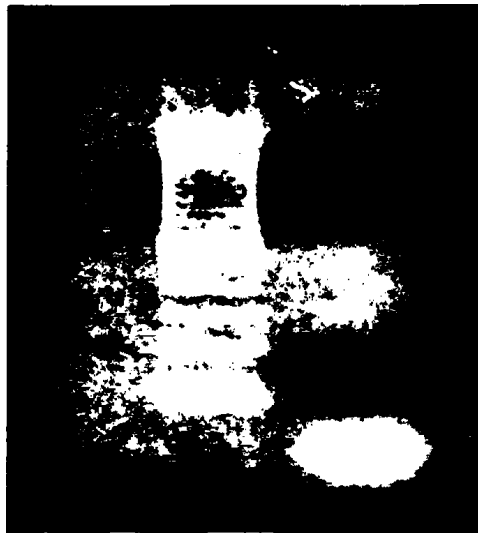


Εικ. 39: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ 100bp DNA Ladder.  
 Διαδρομή 2: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα σε 2% (Δ).





Εικ. 40: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ 100bp DNA Ladder.  
Διαδρομές 2,3: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα σε πηκτή αγαρόζης 2% (Ε).



Εικ. 41: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ 100bp DNA Ladder.  
Διαδρομή 2: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα σε πηκτή αγαρόζης 2% (ΣΤ).



Εικ. 42: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ 100bp DNA Ladder.  
 Διαδρομές 2,3: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα  
 σε πηκτή αγαρόζης 2% (Z).

### B) semi-nested PCR

Το πρώτο στάδιο της semi-nested PCR (Εικόνα 43) τελέστηκε κάτω από τις ακόλουθες συνθήκες:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
DNA	380ng/rxn
Buffer 10x	1x
MgSO <sub>4</sub> (50mM)	4mM
Primer F	50mM
Primer R	50mM
dNTPs (2,5mM)	0,2mM
Platinum® Pfx DNA Polymerase	1,75U/rxn

Οι κύκλοι της αντίδρασης είχαν ως εξής:

1. 94°C για 5min,
2. 94°C για 30sec,
3. 51°C για 30sec,
4. 72°C για 30sec,
5. Επανάληψη των σταδίων 2-4 άλλες 39 φορές
6. 72°C για 10min



Εικ. 43: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ 100bp DNALadder.

Διαδρομές 2,3: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα σε πηκτική αγαρόζη 2% μετά το πρώτο στάδιο της semi-nested PCR.

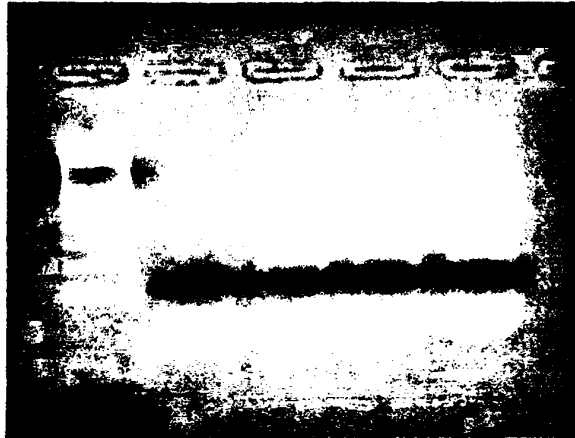
Το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης είχε ως εξής:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	
	A	B
PCR product	200ng/rxn	380ng/rxn
Buffer 10x	1x	1x
MgSO <sub>4</sub> (50mM)	4mM	4mM
Primer F	50mM	50mM
Primer R'	50mM	50mM
dNTPs (2,5mM)	0,2mM	0,2mM
Platinum® Pfx DNA Polymerase	1,75U/rxn	1,75U/rxn

Οι κύκλοι της αντίδρασης είχαν ως εξής:

1. 94°C για 5min,
2. 94°C για 30sec,
3. 51°C για 30sec,
4. 72°C για 30sec,
5. Επανάληψη των σταδίων 2-4 άλλες 29 φορές
6. 72°C για 10min

Οι προσπάθειες ενίσχυσης του Β-κυτταρικού υποδοχέα με χρήση των πριμοδοτικών μορίων των Mishima et al. και της πολυμεράσης Platinum® Pfx DNA μέσω της αντίδρασης semi-nested PCR, δεν οδήγησαν σε επιθυμητά αποτελέσματα (Εικόνα 44).



*Εικ. 44: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ 100bp DNA Ladder.*

*Διαδρομές 2,4: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα σε πηκτή αгарόζης 2% μετά το δεύτερο στάδιο της semi-nested PCR (A).*

*Διαδρομές 3,5: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το Β-κυτταρικό υποδοχέα σε πηκτή αгарόζης 2% μετά το δεύτερο στάδιο της semi-nested PCR (B).*

### 3.3 ΠΡΙΜΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΠΑΚΕΤΟΥ ΥΛΙΚΩΝ INVIVOSCRIBE TECHNOLOGIES

Η διεξαγωγή των αντιδράσεων PCR έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας InVivoScribe Technologies για το πακέτο υλικών IGH Gene Rearrangement Assay.

Οι συνθήκες ήταν οι ακόλουθες:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
DNA	200ng/rxn
Master mix	Βλέπε παρακάτω
Platinum® Taq DNA Polymerase	1U/rxn

Οι κύκλοι της αντίδρασης έγιναν επίσης σύμφωνα με τις οδηγίες της InVivoScribe Technologies αλλά με ελάχιστες τροποποιήσεις λόγω της χρήσης της πολυμεράσης Platinum® Taq DNA Polymerase:

1. 94°C για 2min,
2. 94°C για 30sec,
3. 55°C για 30sec,
4. 72°C για 1min,
5. Επανάληψη των σταδίων 2-4 άλλες 39 φορές
6. 72°C για 10min

Το Master mix που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση, περιείχε μίγμα των πριμοδοτικών μορίων για το εκάστοτε πλαίσιο (FR1, FR2, FR3) και τα απαραίτητα κατιόντα μαγνησίου για τη διεξαγωγή της PCR. Η ακριβής του σύσταση αποτελεί ιδιοκτησία της εταιρίας InVivoScribe Technologies και δεν είναι γνωστή.

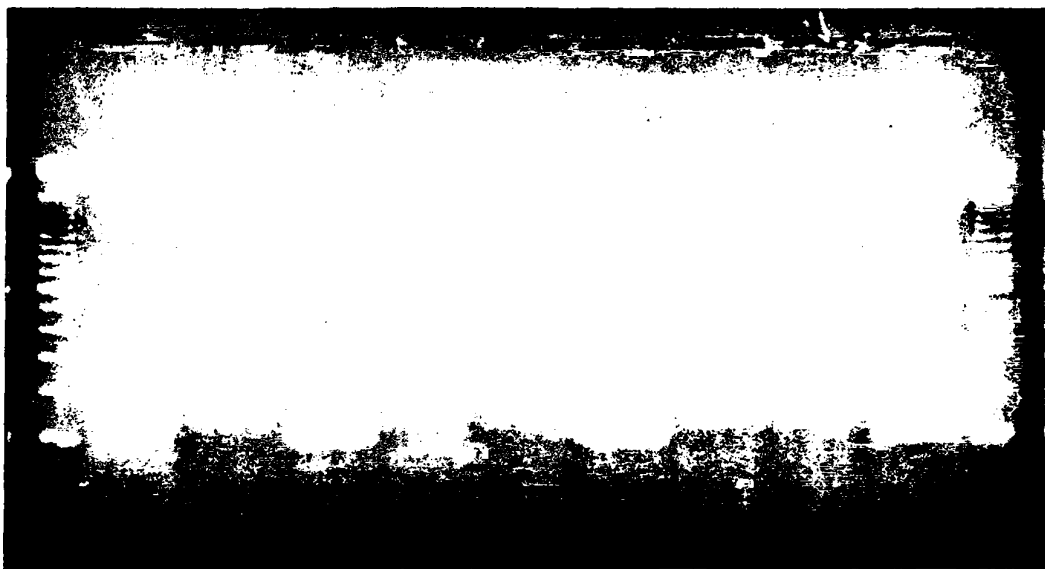


Επιτυχημένη διεξαγωγή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης οδηγεί στην ενίσχυση τμημάτων DNA μεγέθους:

- 69-129bp για το FR1
- 235-295bp για το FR2
- 290-360bp για το FR3

Η χρήση του πακέτου υλικών IGH Gene Rearrangement Assay και της πολυμεράσης Platinum® Taq DNA φάνηκε να ενισχύει με επιτυχία το Β-κυτταρικό υποδοχέα (Εικόνες 45 και 46).

Για τον έλεγχο της ποιότητας του γενετικού υλικού, χρησιμοποιήθηκε ένα επιπλέον Master mix το οποίο συμπεριλαμβάνεται στο πακέτο υλικών IGH Gene Rearrangement Assay. Το συγκεκριμένο Master mix περιείχε εκτός από τα απαραίτητα κατιόντα μαγνησίου για τη διεξαγωγή της PCR και δύο πριμοδοτικά μόρια ειδικά για την περιοχή HLA-DQα. Οι συνθήκες διεξαγωγής της PCR ήταν ίδιες με αυτές για το Β-κυτταρικό υποδοχέα, ενώ επιτυχημένη διεξαγωγή της οδηγεί στην ενίσχυση τμημάτων DNA μεγέθους 235bp (Εικόνα 46).



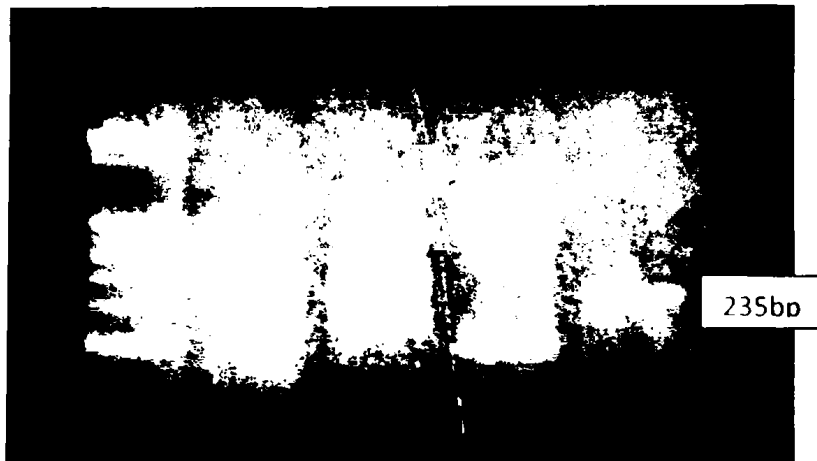
Σικ. 45: Διαδρομές 1,11: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ 100bp DNA Ladder.

Διαδρομές 2,5,8: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το FR1 του Β-κυτταρικού υποδοχέα σε πηκτή αгарόζης 2%.

Διαδρομές 3,6,9: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το FR2 του Β-κυτταρικού υποδοχέα σε πηκτή αгарόζης 2%.

Διαδρομές 4,7,10: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το FR3 του Β-κυτταρικού υποδοχέα σε πηκτή αгарόζης 2%.





*Εικ. 46: Διαδρομή 1: Πρότυπο μοριακών βαρών TrackIt™ 100bp DNA Ladder.*

*Διαδρομή 2: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το FR1 του Β-κυτταρικού υποδοχέα σε πηκτική αгарόζης 2%.*

*Διαδρομή 3: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το FR2 του Β-κυτταρικού υποδοχέα σε πηκτική αгарόζης 2%.*

*Διαδρομή 4: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για το FR3 του Β-κυτταρικού υποδοχέα σε πηκτική αгарόζης 2%.*

*Διαδρομή 5: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR για τον έλεγχο της ποιότητας του DNA σε πηκτική αгарόζης 2%.*

#### **4. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ DNA ΜΕ ΤΟ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ MEGA 4 ΚΑΙ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΠΑΡΟΜΟΙΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΥ BLAST**

Μετά την ανάγνωση της αλληλουχίας των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, όλες οι αλληλουχίες εξετάστηκαν με χρήση του προγράμματος MEGA 4 ώστε να επιλεγεί το τμήμα εκείνο που ανταποκρίνεται στο εκάστοτε ένθεμα. Σύμφωνα με τον περιοριστικό χάρτη του φορέα κλωνοποίησης pCRII® – TOPO® της εταιρίας Invitrogen, το ένθεμα περιέχεται μεταξύ των εξανουκλεοτιδίων GAATTC τα οποία αναγνωρίζονται από το περιοριστικό ένζυμο *EcoRI*. Με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA 4, βρέθηκαν τα ανωτέρω εξανουκλεοτίδια και επιλέχθηκε μόνο η μεταξύ τους αλληλουχία.

Ακολούθως, έγινε συγκριτική αντιστοίχιση των αλληλουχιών με τη βοήθεια του αλγορίθμου CLUSTALW για το καθένα από τα τρία πλαίσια (FR1,FR2,FR3) του Β-κυτταρικού υποδοχέα και κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα φυλογενετικά δέντρα με τη μέθοδο κατασκευής Neighbor-Joining.

Τα τμήματα των αλληλουχιών που περικλείονταν από τις περιοχές αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *EcoRI* χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση παρόμοιων αλληλουχιών, ήδη κατατεθειμένων σε ειδική βάση δεδομένων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος BLAST και στις αλληλουχίες που βρέθηκαν, έγινε συγκριτική αντιστοίχσή τους με τις αλληλουχίες που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή μέσω του αλγορίθμου CLUSTALW.



**A) Συγκριτική αντιστοίχιση μέσω του αλγορίθμου CLUSTALW των αλληλουχιών που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή.**

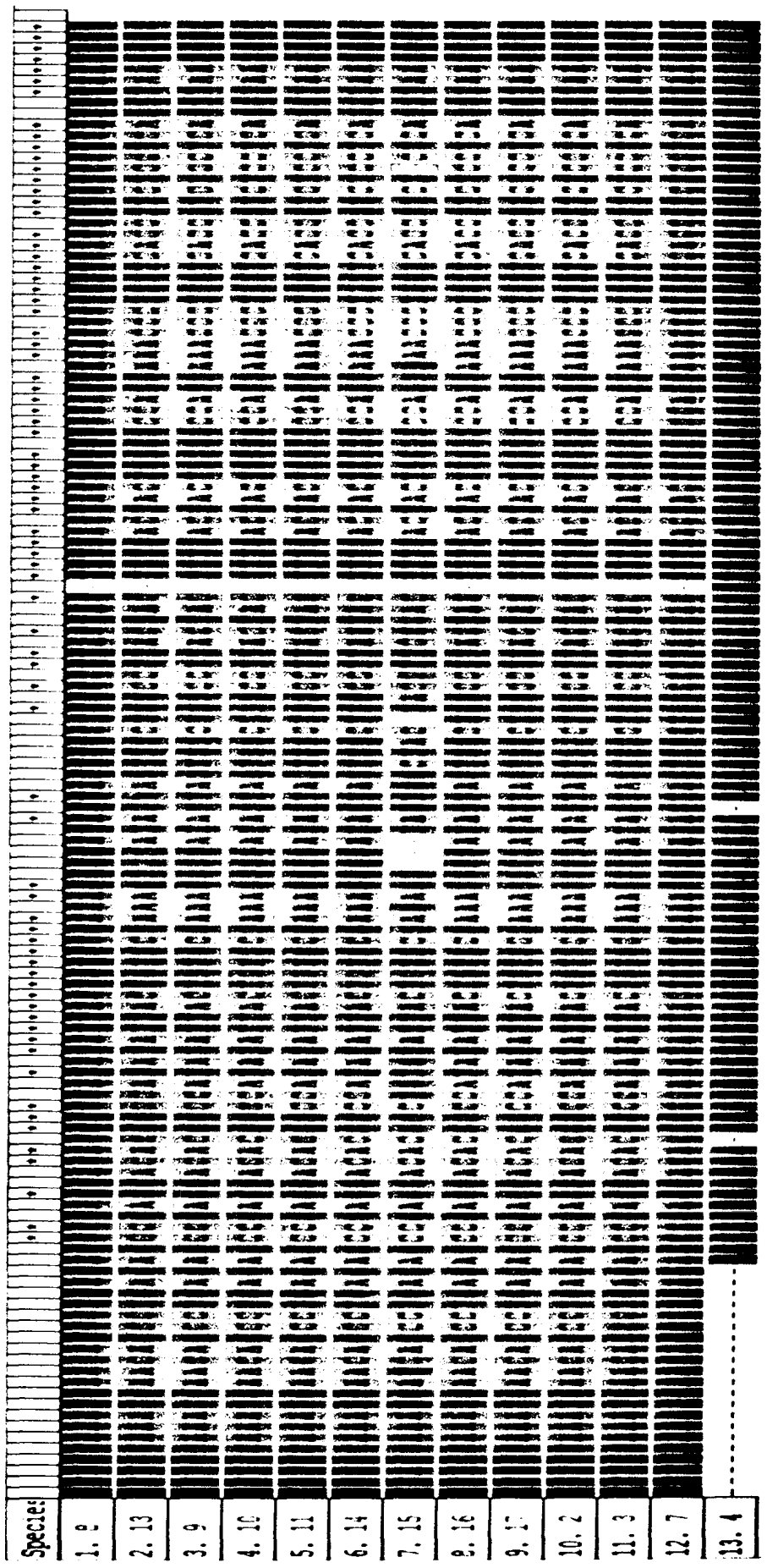
Στις εικόνες 47 - 49 παρουσιάζεται η συγκριτική αντιστοίχιση των αλληλουχιών που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή μέσω του αλγορίθμου CLUSTALW.



... .. .. .



DNA Sequences Translated Protein Sequences



κ. 47: Συγκριτική αντιστοίχιση των αλληλουχιών για το FR1 μέσω του αλγορίθμου CLUSTALW του προγράμματος MEGA 4.





DNA Sequences Translated Protein Sequences

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. 9	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
2. 13	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
3. 10	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
4. 11	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
5. 14	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
6. 15	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
7. 16	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
8. 12	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
9. 17	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
10. 1	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
11. 3	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
12. 2	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
13. 4	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
14. 7	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
15. 6	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
16. 5	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
17. 8	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG

z. 49: Συγκριτική αντιστοίχιση των αλληλουχιών για το FR3 μέσω του αλγορίθμου CLUSTALW του προγράμματος MEGA 4.



**B) Εύρεση παρόμοιων αλληλουχιών μέσω του αλγόριθμου BLAST.-****I. Πριμοδοτικά μόρια (primers) κατά Meier *et al.***

<b>A/a ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ</b>	<b>ΠΑΡΟΜΟΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ</b>
6	Chromosome 9
	Homo sapiens purine nucleoside phosphorylase (PNP)
	Pongo abelii solute carrier family 35, member D3 (SLC35D3)
	Chromosome 14, KIAA gene
	Chromosome 8, Homo sapiens zinc finger and AT hook domain containing (ZFAT)
	Chromosome 11q
7	Chromosome 15
12	Chromosome 9
	Synthetic construct DNA, gene for N-acetyltransferase 9
	Chromosome 8, Homo sapiens zinc finger and AT hook domain containing (ZFAT)
	Synthetic construct DNA, gene for N-acetyltransferase 9
15	Homo sapiens protein arginine methyltransferase 7 (PRMT7)
	Chromosome 9q34

Τα παραπάνω ευρήματα απέδειξαν ότι η χρήση των πριμοδοτικών μορίων κατά Meier *et al.* σε αντιδράσεις PCR για την ενίσχυση του Β-κυτταρικού υποδοχέα, δεν οδηγούν στο επιθυμητό αποτέλεσμα. Αν και τα παραγόμενα προϊόντα της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης ανταποκρίνονται από άποψη μεγέθους στα αναμενόμενα, ωστόσο, λόγω μη ειδικής σύνδεσης (non-specific binding) των πριμοδοτικών μορίων με το







Α/α ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ	ΠΑΡΟΜΟΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ		
	FR1	FR2	FR3
1	-	IgHV3-23*01 IgHV3-23*01	IgHV3-23*01
2	IgHV3-23*01	IgHV3-23*01	IgHV3-23*01
3	IgHV3-23*01	IgHV3-23*01	IgHV3-23*01
4	-	IgHV3-23*01	IgHV3-23*01
5	-	IgHV3-23*01	IgHV3-23*01
6	-	-	IgHV3-23*01
7	IgHV3-23*01	IgHV3-23*01	IgHV3-23*01
8	IgHV3-23*01	-	IgHV3-23*01
9	IgHV3-23*01	IgHV3-23*01	IgHV3-23*01
10	IgHV3-23*01	IgHV3-23*01	IgHV3-23*01
11	IgHV3-23*01	-	IgHV3-23*01
12	-	IgHV3-23*01	IgHV3-23*01
13	IgHV3-23*01	-	IgHV3-23*01
14	IgHV3-23*01	-	IgHV3-23*01
15	IgHV3-23*01	-	IgHV3-23*01
16	IgHV3-23*01	-	IgHV3-23*01
17	IgHV3-23*01	-	IgHV3-23*01

Η ομοιότητα των αλληλουχιών που παρήχθησαν κατά την παρούσα διδακτορική διατριβή με τις ήδη κατατεθειμένες κυμαίνεται μεταξύ 87-95%. Στην πλειοψηφία των αναδιατάξεων που ανιχνεύσαμε, συμμετέχουν τα γονίδια της οικογένειας IgHV3-23\*01.



**Γ) Συγκριτική αντιστοίχιση μέσω του αλγορίθμου CLUSTALW των αλληλουχιών που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή με παρόμοιες αλληλουχίες.**

Στις εικόνες 51 - 53 παρουσιάζεται η συγκριτική αντιστοίχιση των αλληλουχιών που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή με παρόμοιες αλληλουχίες, μέσω του αλγορίθμου CLUSTALW.





DNA Sequences Translated Protein Sequences

Species/Abbrev	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1. 9	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
2. 10	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
3. 12	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
4. 1 BAND1	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
5. 1 BAND2	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
6. 3	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
7. 2	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
8. 4	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
9. 7	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
10. 5	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
11. AY169266.1	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
12. AY667425.1	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
13. U62631.2	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
14. AL049912.3	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
15. AC235559.3	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
16. AC007955.4	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
17. AY671056.1	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
18. AM077457.1	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
19. AF115109.1	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
20. AY671692.1	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
21. AM077517.1	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
22. AM077347.1	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
23. EF417979.1	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
24. EF417978.1	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
25. D0454700.1	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG

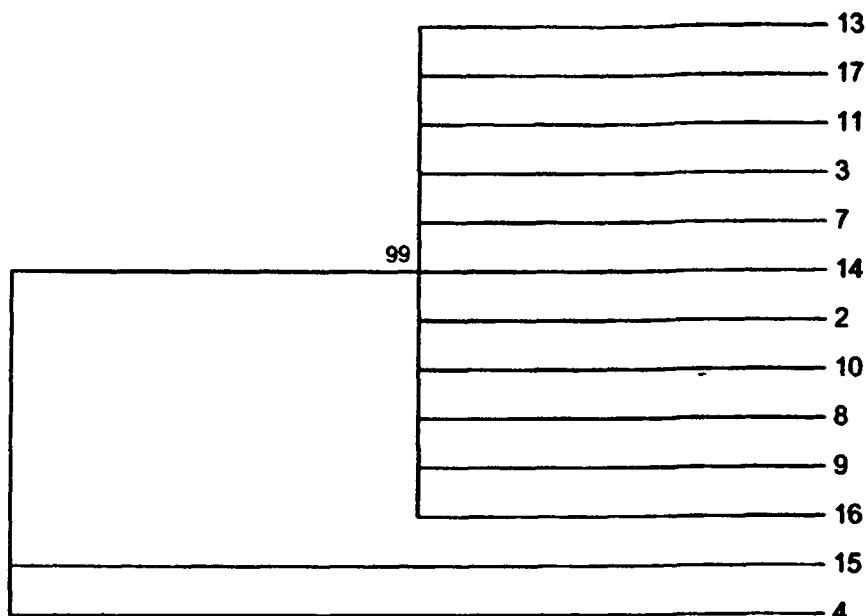


Εικ. 52: Συγκριτική αντιστοιχία όλων των αλληλουχιών για το FR2 μέσω του αλγορίθμου CLUSTALW του προγράμματος MEGA 4.

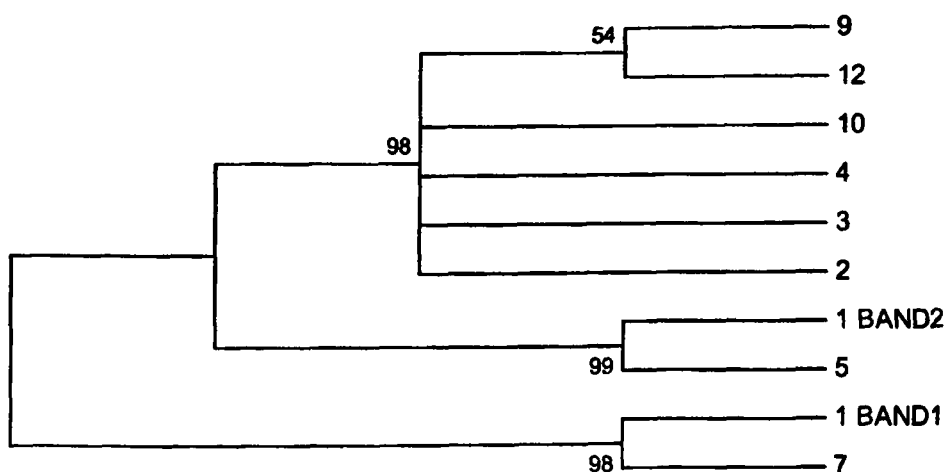


**Δ) Κατασκευή δενδρογραμμάτων για τις αλληλουχίες που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή με τη μέθοδο κατασκευής Neighbor-Joining .**

Στις εικόνες 54 - 56 παρουσιάζονται τα δενδρογράμματα που κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο Neighbor-Joining, για τις αλληλουχίες που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή.

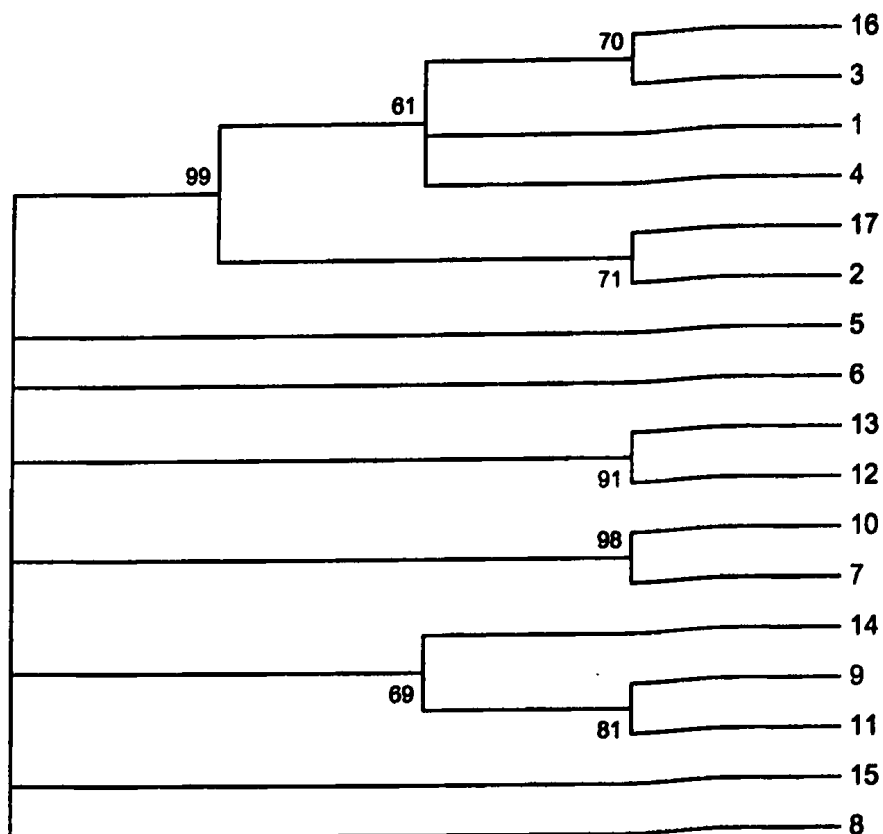


*Εικ. 54: Κατασκευή δενδρογράμματος με βάση τις αλληλουχίες για το FR1.*



*Εικ. 55: Κατασκευή δενδρογράμματος με βάση τις αλληλουχίες για το FR2.*

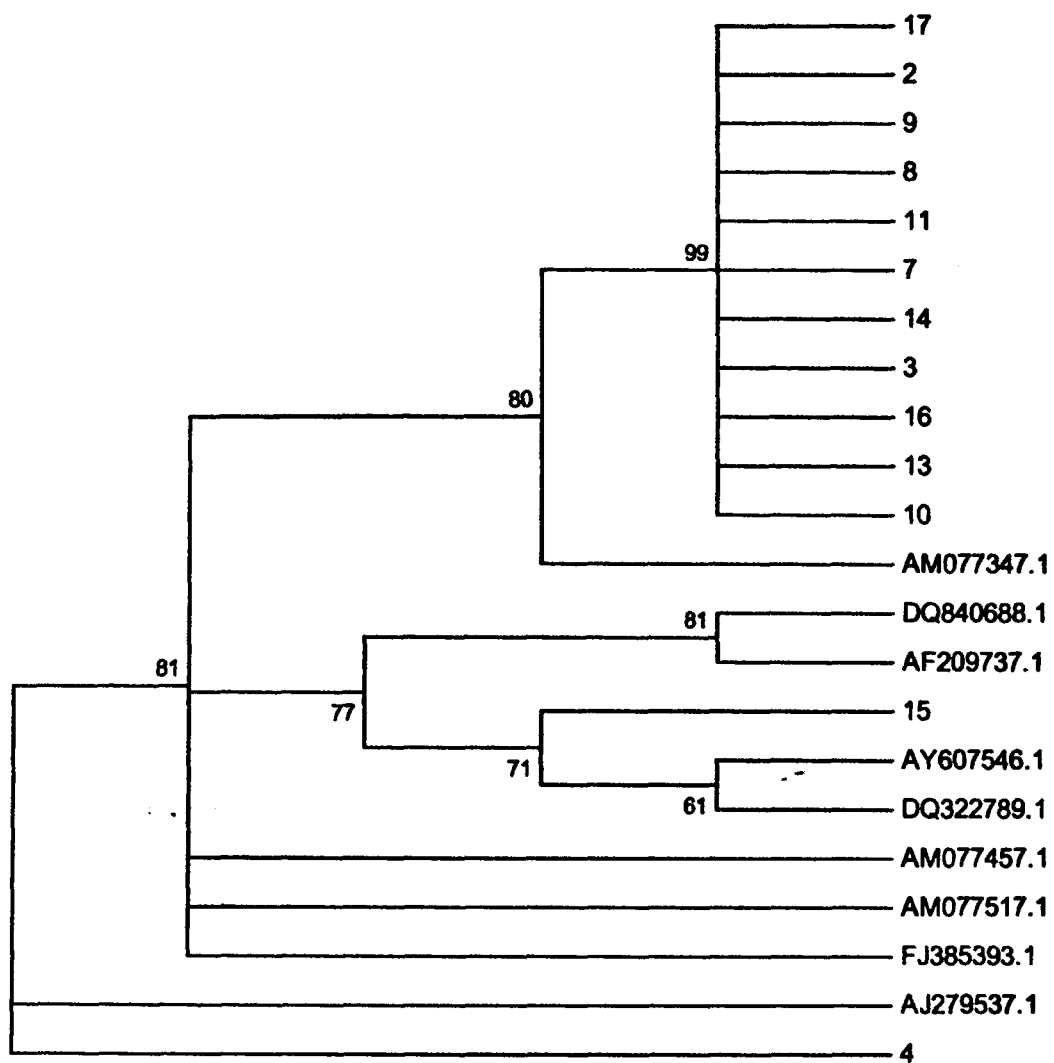




Εικ. 56: Κατασκευή δενδρογράμματος με βάση τις αλληλουχίες για το FR3.

**Ε) Κατασκευή δενδρογραμμάτων για τις αλληλουχίες που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή και για παρόμοιες αλληλουχίες με τη μέθοδο κατασκευής Neighbor-Joining.**

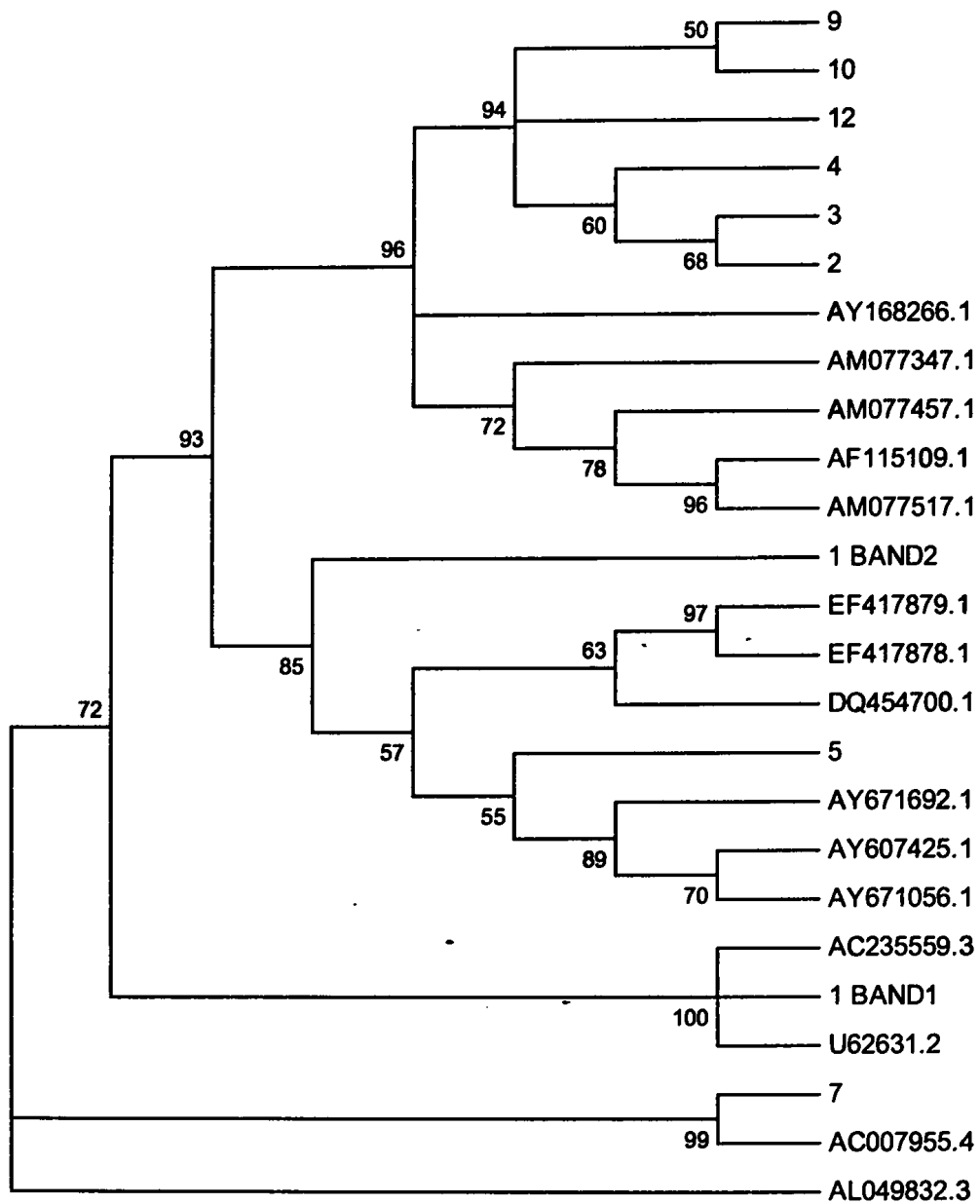
Στις εικόνες 57 - 59 παρουσιάζονται τα δενδρογράμματα που κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο Neighbor-Joining, για τις αλληλουχίες που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή και για παρόμοιες αλληλουχίες.



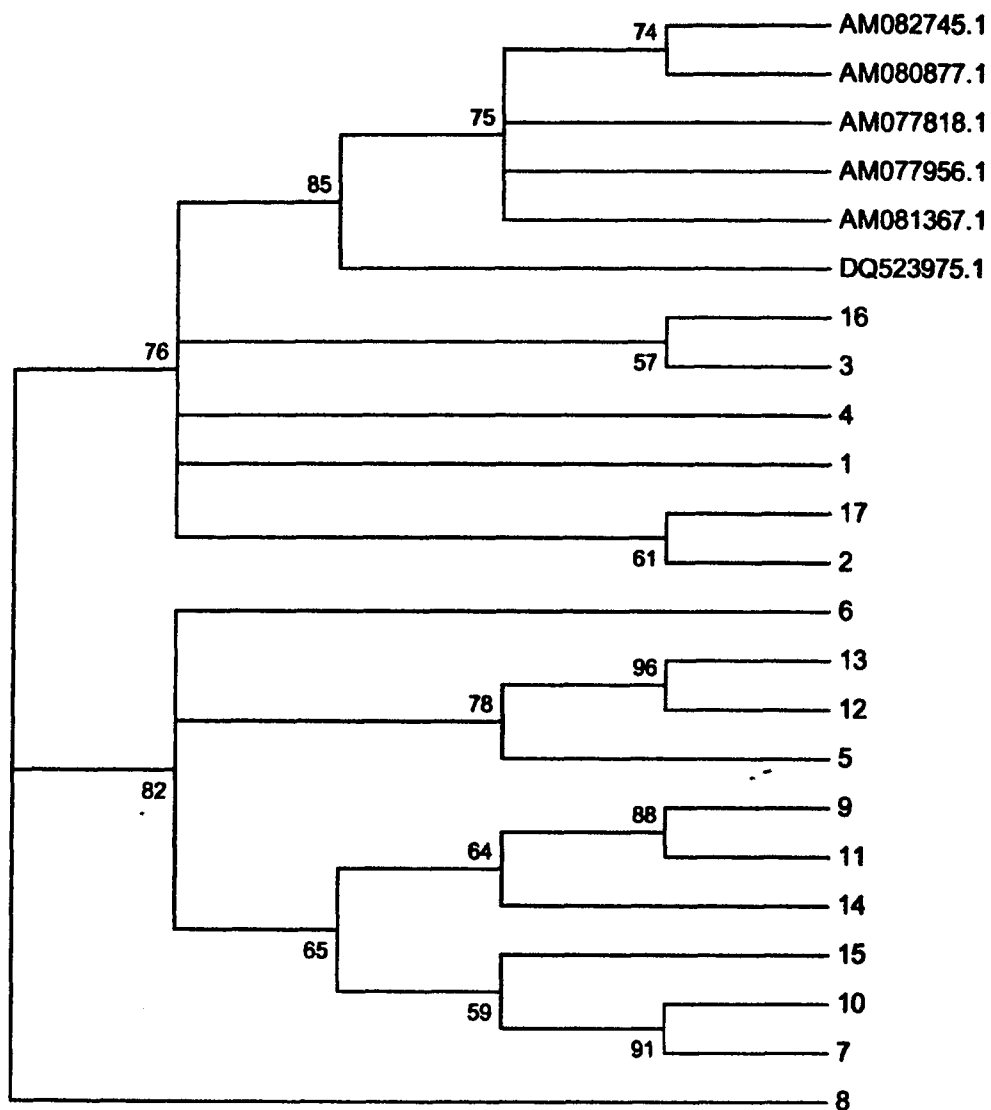
Εικ. 57: Κατασκευή δενδρογράμματος με βάση τις αλληλουχίες για το FR1.







Εικ. 58: Κατασκευή δενδρογράμματος με βάση τις αλληλουχίες για το FR2.



Εικ. 59: Κατασκευή δενδρογράμματος με βάση τις αλληλουχίες για το FR3.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα (DLBCL) αποτελεί τον πιο συχνά παρατηρούμενο τύπο non-Hodgkin λεμφώματος στο Δυτικό κόσμο (25-30%), αριθμώντας 30.000 νέα περιστατικά κάθε χρόνο, με τις αναπτυσσόμενες χώρες να εμφανίζουν το υψηλότερο ποσοστό κρουσμάτων της νόσου (8). Εκτεταμένες μελέτες έχουν δείξει ότι το DLBCL εμφανίζει μεγάλη μορφολογική, ανοσοφαινοτυπική και γενετική/μοριακή ετερογένεια (2-4). Λόγω της μεγάλης ετερογένειας, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) το 2008 διέκρινε το DLBCL σε μορφολογικές ποικιλίες, μοριακούς και φαινοτυπικούς υποτύπους, σύμφωνα με τα μορφολογικά, μοριακά/γενετικά και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των περιπτώσεων DLBCL (1).

Κατά την παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε προσπάθεια να προσεγγιστεί η νόσος με χρήση μοριακών τεχνικών. Στόχοι της μελέτης μας ήταν η ανίχνευση πιθανής μονοκλωνικότητας και των εκάστοτε κλωνικών αναδιατάξεων σε περιπτώσεις οι οποίες είχαν διαγνωσθεί ως διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα από το εργαστήριο Παθολογικής Ανατομίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Επιπρόσθετοι στόχοι της μελέτης μας ήταν αφενός η σύγκριση των κλωνικών αναδιατάξεων που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή με αλληλουχίες αναδιατάξεων οι οποίες έχουν παρατηρηθεί σε άλλες μελέτες και είναι κατατεθειμένες στην παγκόσμια βάση δεδομένων της NCBI, και αφετέρου η εξακρίβωση πιθανής προτιμώμενης αναδιάταξης σε περιστατικά DLBCL στην περιοχή της Ηπείρου.

Η κυριότερη τεχνική της Μοριακής Βιολογίας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) (140) για την ενίσχυση του γονιδιακού τόπου της βαριάς αλυσίδας του Β-κυτταρικού υποδοχέα. Η PCR είναι μία ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδος η οποία απαιτεί πληθώρα ιδιαίτερων και εξειδικευμένων συνθηκών για να αποδώσει



τα επιθυμητά αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό έγινε πληθώρα δοκιμών που αποσκοπούσαν στην εύρεση των ευνοϊκότερων συνθηκών για την τέλεση της PCR (γενετικό υλικό, πριμοδοτικά μόρια κλπ).

Η χρήση του πακέτου υλικών IGH Gene Rearrangement Assay For Identification of B Cell Clonality της InVivoScribe Technologies είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση των κλωνικών αναδιατάξεων του Β-κυτταρικού υποδοχέα σε όλα τα περιστατικά (17/17) τα οποία μελετήσαμε στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Η ομολογία των αλληλουχιών που προέκυψαν από τη μελέτη μας με τις ήδη κατατεθειμένες αναδιατάξεις κυμαίνεται από 87-95%.

Όσον αφορά τα ποσοστά ανίχνευσης των κλωνικών αναδιατάξεων για καθένα από τα επιμέρους πλαίσια, η χρήση των συγκεκριμένων πριμοδοτικών μορίων έδωσε αποτελέσματα σε ποσοστό 70,6% (12/17) έναντι του FR1, 52,9% (9/17) έναντι του FR2 και 100% (17/17) έναντι του FR3. Το γεγονός ότι σε κάποια περιστατικά δεν ανιχνεύθηκαν, μετά από επαναλαμβανόμενες δοκιμές, οι κλωνικές αναδιατάξεις σε ένα ή δύο από τα τρία πλαίσια, αποδίδεται στη χρήση ανεπαρκούς ποσότητας ή κακής ποιότητας DNA-εκμαγείου. Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι η ενίσχυση έναντι του FR2 απέδωσε το χαμηλότερο θετικό ποσοστό. Εάν λάβουμε υπόψιν το γεγονός ότι η περιοχή FR1 είναι μεγαλύτερη της αντίστοιχης για το FR2, θα έπρεπε να εμφανίζει και το χαμηλότερο ποσοστό ενίσχυσης μέσω PCR. Για την ασυνέπεια αυτή πιθανότατα ευθύνονται τα πριμοδοτικά μόρια έναντι του FR2, τα οποία φαίνονται να είναι λιγότερο αποδοτικά σε σχέση με αυτά έναντι των FR1 και FR3.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της διαδικτυακής έρευνας για την εύρεση παρόμοιων αλληλουχιών μέσω του αλγορίθμου BLAST, η κυρίαρχη κλωνική αναδιάταξη είναι η IgHV3-23\*01, όσον αφορά στις περιπτώσεις τις οποίες μελετήσαμε. Η παρουσία μιας κυρίαρχης αναδιάταξης και η προτιμώμενη χρήση VH γονιδίων τα οποία προέρχονται από μία συγκεκριμένη οικογένεια, εγείρει ερωτήματα σχετικά με την αμερόληπτη και τυχαία επιλογή των εν λόγω γονιδίων και του λειτουργικού ρόλου των ανοσοσφαιρινών που κωδικοποιούνται από αυτά. Τα παραπάνω ερωτήματα στηρίζουν παλαιότερες μελέτες οι οποίες αναφέρουν την κυρίαρχη χρήση



γονιδίων της οικογένειας VH3 από αντισώματα έναντι του καψιδιακού πολυσακχαρίτη του *Haemophilus influenza* τύπου β (155, 156) ή τη συμμετοχή αντισωμάτων με γονίδια VH4-21 σε αυτοάνοσα νοσήματα (157-159). Επιπρόσθετα, γονίδια της οικογένειας VH3 – και ειδικότερα το γονίδιο VH3-23 – φαίνεται να επικρατούν έναντι όλων των άλλων ακόμα και σε μελέτες που έχουν γίνει σε υγιή άτομα και αφορούσαν σε φυσιολογικά λεμφοκύτταρα (160-165). Ο Mackworth-Young και οι συνεργάτες του απέδειξαν σε έρευνές τους (166-168) ότι το γονίδιο VH3-23 κωδικοποιεί πολυ-αντιδραστικά αντισώματα, δηλαδή αντισώματα τα οποία έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν ένα μεγάλο εύρος αντιγόνων, συμπεριλαμβανομένων και αυτο-αντιγόνων.

Οι λόγοι στους οποίους οφείλεται η υψηλή συχνότητα εμφάνισης κάποιων συγκεκριμένων γονιδίων – όπως του VH3-23 – έχουν γίνει αντικείμενο πολλών μελετών. Σημαντικό ρόλο πιστεύεται ότι διαδραματίζει η περιοχή συμπληρωματικότητας CDR3, καθώς αντισώματα που φέρουν ίδιου μήκους και νουκλεοτιδικής αλληλουχίας CDR3 φαίνεται να έχουν παρόμοια αντιγονική αντιδραστικότητα (161, 168-170). Ιδιαίτερης σπουδαιότητας είναι και οι ακολουθίες RSS. Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως [2.5 Γονιδιακός ανασυνδυασμός ανοσοσφαιρινών, A) Ανασυνδυασμός V(D)J], οι ακολουθίες RSS είναι εξαιρετικά συντηρούμενες και περιλαμβάνουν ένα μοτίβο από ένα επταμερές (heptamer) (CACAGTG) και ένα εννιαμερές (nonamer) (ACAAAACA). Ωστόσο, είναι δυνατόν τα δύο αυτά μοτίβα να παρουσιάζουν αποκλίσεις από τη συνήθη αλληλουχία τους. Διαφορές στην αλληλουχία του επταμερούς και του εννιαμερούς μοτίβου επηρεάζουν την αναγνώριση από το σύμπλοκο πρωτεϊνών RAG και –κατά συνέπεια – και τον σχηματισμό δομής «φουρκέτας» και τον ανασυνδυασμό V(D)J (171, 172). Φαίνεται δηλαδή ότι οι νουκλεοτιδικές αυτές διαφορές ευνοούν τον ανασυνδυασμό κάποιων γονιδίων, έναντι άλλων. Μελέτες οι οποίες έχουν γίνει σε ποντίκια (173-176), έχουν δείξει ότι VH γονίδια, τα οποία εδράζονται κοντά στον γενετικό τόπο των JH γονιδίων, εμφανίζουν υψηλότερες συχνότητες εμφάνισης σε γεγονότα ανασυνδυασμού σε σύγκριση με πιο μακρινά VH γονίδια.



Οι Lossos *et al.* το 2000 (177) απέδειξαν την αμερόληπτη χρήση VH γονιδίων στα 71 περιστατικά DLBCL τα οποία μελέτησαν. Ωστόσο, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι οι πιο συχνά εμφανιζόμενες αναδιατάξεις ήταν οι VH3-23 και VH4-34 σε ποσοστό 10,3% και 8,6%, αντίστοιχα. Άλλες μελέτες (178-181) σχετικά με την αμερόληπτη ή μη χρήση VH γονιδίων σε περιπτώσεις DLBCL στηρίζουν τα ευρήματα των Lossos *et al.* Οι Daley *et al.* (178) μελέτησαν 10 περιστατικά DLBCL και δε βρήκαν σημαντικές διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης κάποιου συγκεκριμένου VH γονιδίου. Ωστόσο, στη μελέτη αυτή, γονίδια της οικογένειας VH3 φάνηκε να επικρατούν έναντι όλων των άλλων οικογενειών. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Kuppers *et al.* (179), οι οποίοι μελέτησαν 19 περιπτώσεις DLBCL και οι Rosenquist *et al.* (180), οι οποίοι μελέτησαν 35 περιπτώσεις DLBCL. Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι τελευταίοι - αν και μελέτησαν έναν μεγάλο αριθμό περιπτώσεων DLBCL, μέσω αντίδρασης PCR - δε συμπεριέλαβαν στις ερευνητικές μεθόδους τους την κλωνοποίηση και την εύρεση αλληλουχίας (sequencing) των προϊόντων που προέκυψαν από την PCR, όπως έγινε στην παρούσα μελέτη. Για το λόγο αυτό δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί η κλωνικότητα των περιπτώσεων που μελέτησαν. Την μη επιλεκτική χρήση VH γονιδίων επιβεβαίωσαν το 2001 και οι Nakamura *et al.* (181), οι οποίοι μελέτησαν 10 περιπτώσεις CD5+ DLBCL και 29 περιπτώσεις CD5- DLBCL.

Παλαιότερη μελέτη των Hsu *et al.* (182) το 1995 είχε δείξει την προτιμώμενη «χρήση» της αναδιάταξης VH4-21 σε περιστατικά DLBCL. Η μελέτη τους περιέλαβε 17 περιπτώσεις DLBCL, σε 15 από τις οποίες η βαριά αλυσίδα του Β-κυτταρικού υποδοχέα αποτελούνταν από V γονίδια της οικογένειας VH4 (88%), 1 από γονίδια της οικογένειας VH1 (6%) και 1 της οικογένειας VH3 (6%). Ειδικότερα, 11 από τις 15 περιπτώσεις που εμφάνιζαν γονίδια της οικογένειας VH4-21. Οι Funkhouser *et al.* (183) απέδειξαν την προτιμώμενη χρήση των γονιδίων της οικογένειας VH4-34 στο 38% των περιστατικών DLBCL και στο 35% των λεμφωμάτων από κύτταρα του μανδύα (Mantle Cell Lymphoma / MCL) που μελέτησαν με χρήση του αντισώματος



9G4. Σε παρόμοια ευρήματα κατέληξε και η μελέτη των Stevenson *et al.* (184), οι οποίοι χρησιμοποίησαν επίσης το αντίσωμα 9G4.

Άλλες μελέτες, οι οποίες αφορούσαν στην ανίχνευση της κυρίαρχης αναδιάταξης, είχαν αποδείξει την προτιμώμενη «χρήση» της αναδιάταξης VH3-21 σε περιστατικά MCL (185, 186). Οι Kirps *et al.* (187) πρότειναν την αναδιάταξη VH1-69 και οι Fais *et al.* (188) την αναδιάταξη VH4-34 σε περιπτώσεις Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας (Chronic Lymphocytic Leukaemia / CLL). Η αναδιάταξη VH4-21 αναφέρεται και ως η κυρίαρχη αναδιάταξη σε περιπτώσεις λεμφωμάτων σχετιζόμενων με την ασθένεια του AIDS στη μελέτη των Riboldi *et al.* (189).

Ιδιαίτερης προσοχής χρήζει το περιστατικό #1 της μελέτης μας. Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης έναντι του FR2 για το συγκεκριμένο περιστατικό οδήγησε στην ενίσχυση δύο διαφορετικών περιοχών DNA και στην εμφάνιση δύο θραυσμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 2%, τα οποία ανταποκρίνονταν στα αναμενόμενα μεγέθη. Η εύρεση της αλληλουχίας τους και η σύγκρισή τους με κατατεθειμένες αλληλουχίες είχε ως αποτέλεσμα την επιβεβαίωση ότι και οι δύο αλληλουχίες ανταποκρίνονται σε κλωνικές αναδιατάξεις του Β-κυτταρικού υποδοχέα. Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευθεί ως εξής: η μία αλληλουχία προέκυψε από την πρώτη αναδιάταξη του Β-κυτταρικού υποδοχέα, η οποία όμως ήταν μη παραγωγική (non-productive). Η δεύτερη αλληλουχία ανταποκρίνεται στην αναδιάταξη του ομόλογου χρωμοσώματος, η οποία ήταν και η παραγωγική.

Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει για τα περιστατικά #2, #3 και #4 της μελέτης μας τα οποία δεν αφορούν λεμφώματα DLBCL. Τα συγκεκριμένα περιστατικά έχουν διαγνωσθεί ως χρόνια ενεργός γαστρίτιδα, florid ποικιλία οζώδους/θυλακιδώδους λεμφώματος και δέρμα μετά από τσίμπημα εντόμου, αντίστοιχα. Σε μελέτες οι οποίες έχουν γίνει σχετικά με την παρουσία μονοκλωνικών πληθυσμών Β-λεμφοκυττάρων σε περιστατικά γαστρίτιδας, τα θετικά αποτελέσματα κλωνικότητας κυμαίνονταν από 0%-85% (190-193). Οι διαφορές αυτές μπορούν να αποδοθούν στα διαφορετικά πρωτόκολλα



Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης που ακολουθήθηκαν από την εκάστοτε ερευνητική ομάδα. Όσον αφορά στο περιστατικό οζώδους/θυλακιώδους λεμφώματος, η συγκεκριμένη πάθηση είναι γνωστό ότι εμφανίζει κλωνικότητα και έχει μελετηθεί εκτεταμένα στο παρελθόν (194-201). Αναφορές έχουν γίνει και για περιστατικά όπου ανιχνεύθηκε μονοκλωνικότητα Β-λεμφοκυττάρων σε δείγματα δέρματος μετά από τσίμπημα εντόμου (202, 203). Στις περιπτώσεις αυτές, υπερευαισθησία των ασθενών στο τσίμπημα του εντόμου προκάλεσε την ενεργοποίηση του ιού Epstein-Barr (EBV), με αποτέλεσμα την εμφάνιση λεμφώματος.





## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης μας προκύπτει το συμπέρασμα ότι η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης έναντι του πλαισίου FR3 της βαριάς αλυσίδας του Β-κυτταρικού υποδοχέα αποτελεί την προτιμότερη επιλογή για τη διαπίστωση πιθανής μονοκλωνικότητας σε περιστατικά DLBCL, καθώς κατάφερε να ενισχύσει με επιτυχία τις επιθυμητές περιοχές σε ποσοστό 100%.

Ένα δεύτερο συμπέρασμα που προκύπτει από την παρούσα εργασία είναι ότι η εύρεση της αλληλουχίας της κάθε αναδιάταξης είναι απαραίτητη αφενός γιατί επιβεβαιώνει την επιτυχημένη διεξαγωγή των αντιδράσεων PCR και αφετέρου γιατί μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση με άλλες αλληλουχίες μέσω του αλγορίθμου BLAST και να οδηγήσει στην αναγνώριση της εκάστοτε αναδιάταξης.

Τέλος, βάση των αποτελεσμάτων μας, η αναδιάταξη που κυριαρχεί στις περιπτώσεις τις οποίες εξετάσαμε περιλαμβάνει τα γονίδια της οικογένειας IgHV3-23 και συγκεκριμένα το γονίδιο IgHV3-23\*01. Η κυριαρχία της συγκεκριμένης αναδιάταξης χρήζει περαιτέρω μελέτης, ώστε να διαπιστωθεί ο πιθανός ρόλος της στην εξέλιξη της νόσου σε σύγκριση με περιστατικά στα οποία κυριαρχεί αναδιάταξη που περιλαμβάνει διαφορετικά VH γονίδια, καθώς και ο σχεδιασμός φαρμάκων ειδικών έναντι των κυττάρων που φέρουν τη συγκεκριμένη αναδιάταξη.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα (DLBCL) αποτελεί τον πιο συχνά εμφανιζόμενο τύπο non-Hodgkin λεμφώματος στο Δυτικό κόσμο (25-30%) και αποτελεί μία νόσο με μεγάλη μορφολογική, ανοσοφαινοτυπική και γενετική/μοριακή ετερογένεια.

Οι στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής περιλάμβαναν την ανίχνευση μονοκλωνικότητας σε ιστολογικά δείγματα ασθενών με DLBCL με χρήση μοριακών τεχνικών, την αναγνώριση των εκάστοτε αναδιατάξεων και τη σύγκρισή τους με αλληλουχίες κατατεθειμένες σε παγκόσμια βάση δεδομένων και τέλος την ανίχνευση πιθανής κυρίαρχης αναδιάταξης στα μελετούμενα περιστατικά.

### Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια:

Το πρώτο στάδιο περιλάμβανε την εύρεση των κατάλληλων συνθηκών για τη διεξαγωγή πειραμάτων Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης, ώστε να επιτευχθεί η ενίσχυση των τριών πλαισίων (FR1, FR2, FR3) της βαριάς αλυσίδας του Β-κυτταρικού υποδοχέα. Παράμετροι οι οποίοι εξετάστηκαν ήταν η απομάκρυνση της παραφίνης ώστε να αποφευχθεί η ανασταλτική δράση της σε αντιδράσεις PCR, η εύρεση των κατάλληλων πριμοδοτικών μορίων και των βέλτιστων θερμοκρασιών και συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων που θα συμμετείχαν στις PCR. Το πρώτο στάδιο της παρούσας μελέτης ολοκληρώθηκε με την αλληλούχιση των αναδιατάξεων που προέκυψαν.

Το δεύτερο στάδιο της μελέτης μας αφορούσε στην επεξεργασία των προαναφερόμενων αναδιατάξεων με υπολογιστικά προγράμματα, όπως το MEGA 4 και με αλγορίθμους, όπως ο BLAST και ο CLUSTALW. Η επεξεργασία αυτή απσκοπούσε στη σύγκριση των αναδιατάξεων με άλλες γνωστές αλληλουχίες και στην εύρεση πιθανής κυρίαρχης αναδιάταξης.



### Αποτελέσματα:

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποδεικνύουν την ικανότητα ανίχνευσης μονοκλωνικότητας σε όλες τις μελετηθείσες περιπτώσεις με τη χρήση των πρωμοδοτικών μορίων έναντι του FR3, τα οποία συστήνουμε για ανάλογες μελέτες.

Η σύγκριση των αλληλουχιών που προέκυψαν από τη μελέτη μας με ήδη γνωστές αλληλουχίες αναδιατάξεων και η ομοιότητά τους σε ποσοστό 92-97% με αυτές, μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η αναδιάταξη η οποία κυριαρχεί στις μελετηθείσες περιπτώσεις περιλαμβάνει τα γονίδια της οικογένειας IgHV3-23\*01. Η κυριαρχία των συγκεκριμένων γονιδίων μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η επιλογή τους κατά την ωρίμανση των Β-λεμφοκυττάρων δεν αποτελεί τυχαίο γεγονός και για το λόγο αυτό θα πρέπει να εξεταστεί περαιτέρω ο ρόλος τους στην εξέλιξη της νόσου και η πιθανή συμβολή τους σε προσπάθειες θεραπευτικής αντιμετώπισης της νόσου.



## SUMMARY

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) represents the most common type of non-Hodgkin's lymphomas in Western countries (25-30%) and constitutes a disease with great morphological, immunophenotypic and genetic/molecular heterogeneity.

The aims of this study included the search of monoclonality in DLBCL cases using molecular techniques, the possible identification of specific rearrangements and their comparison to sequences that are already published in a global database and finally, the identification of the prominent rearrangement within our cases studied.

### Our study took place in two stages:

During the first stage we determined the proper conditions for the Polymerase Chain Reaction, in order to amplify the three frames (FR1, FR2, FR3) of the B-cell receptor's heavy chain. The examined factors included the removal of excess paraffin in order to avoid its inhibitory action during PCR, the selection of the proper primers and of the optimum PCR temperatures and component concentrations. The first stage of this study was completed with the sequencing of the rearrangements detected.

The second stage of our study consisted of the processing of the aforementioned rearrangements with computational programs such as MEGA 4 and algorithms like BLAST and CLUSTALW. This processing aimed at the comparison of the rearrangements with other already known sequences and at the identification of a possible dominant rearrangement.



## Results:

Our results showed that monoclonality detected in all the studied cases by using the FR3 specific primers, which therefore we recommend for similar studies.

The comparison of sequences, obtained in our study with others already known and the resulting similarities (92-97%), led us to the conclusion that the dominant rearrangement among the cases studied includes the IgHV3-23\*01 genes. These genes' dominance suggests that their "selection" during B-cell maturation is not unbiased and therefore, there should be further research concerning their involvement in the clinical outcome of DLBCL, as well as their possible contribution to therapy.



**I. ΑΡΘΡΑ**

1. Swerdlow S. CE, Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. WHO Classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC; 2008.
2. Pileri SA, Dirnhofer S, Went P, Ascani S, Sabattini E, Marafioti T, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: one or more entities? Present controversies and possible tools for its subclassification. *Histopathology*. 2002 Dec;41(6):482-509.
3. Berglund M, Enblad G, Flordal E, Lui WO, Backlin C, Thunberg U, et al. Chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Mod Pathol*. 2002 Aug;15(8):807-16.
4. de Leval L, Harris NL. Variability in immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its clinical relevance. *Histopathology*. 2003 Dec;43(6):509-28.
5. Cigudosa JC, Parsa NZ, Louie DC, Filippa DA, Jhanwar SC, Johansson B, et al. Cytogenetic analysis of 363 consecutively ascertained diffuse large B-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999 Jun;25(2):123-33.
6. Monni O, Joensuu H, Franssila K, Knuutila S. DNA copy number changes in diffuse large B-cell lymphoma--comparative genomic hybridization study. *Blood*. 1996 Jun 15;87(12):5269-78.
7. Soukup J, Krskova L, Mrhalova M, Kodet R, Campr V, Kubackova K, et al. [Large-cell diffuse B-cell lymphoma: heterogenous origin and prognosis from the aspect of modern diagnosis]. *Cas Lek Cesk*. 2003;142(7):417-22.
8. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol*. 1998 Aug;16(8):2780-95.
9. Chan WJ. Pathogenesis of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Hematol*. 2010 Sep;92(2):219-30.
10. World Health Organization. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2008.
11. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000 Feb 3;403(6769):503-11.
12. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002 Jun 20;346(25):1937-47.
13. Iqbal J, Greiner TC, Patel K, Dave BJ, Smith L, Ji J, et al. Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2007 Nov;21(11):2332-43.
14. Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC, Staudt LM, Weisenburger DD, Pickering DL, et al. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood*. 2002 Apr 1;99(7):2285-90.
15. Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE, Rosenwald A, Pickering DL, Dave B, et al. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol*. 2004 Jul;165(1):159-66.
16. Barrans SL, Evans PA, O'Connor SJ, Kendall SJ, Owen RG, Haynes AP, et al. The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome. *Clin Cancer Res*. 2003 Jun;9(6):2133-9.



17. Staudt LM. Gene expression physiology and pathophysiology of the immune system. *Trends Immunol.* 2001 Jan;22(1):35-40.
18. Davis RE, Staudt LM. Molecular diagnosis of lymphoid malignancies by gene expression profiling. *Curr Opin Hematol.* 2002 Jul;9(4):333-8.
19. Ladanyi M, Offit K, Jhanwar SC, Filippa DA, Chaganti RS. MYC rearrangement and translocations involving band 8q24 in diffuse large cell lymphomas. *Blood.* 1991 Mar 1;77(5):1057-63.
20. Yoon SO, Jeon YK, Paik JH, Kim WY, Kim YA, Kim JE, et al. MYC translocation and an increased copy number predict poor prognosis in adult diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), especially in germinal centre-like B cell (GCB) type. *Histopathology.* 2008 Aug;53(2):205-17.
21. Saez AI, Artiga MJ, Romero C, Rodriguez S, Cigudosa JC, Perez-Rosado A, et al. Development of a real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for c-myc expression that allows the identification of a subset of c-myc+ diffuse large B-cell lymphoma. *Lab Invest.* 2003 Feb;83(2):143-52.
22. De Jong D, Voetdijk BM, Beverstock GC, van Ommen GJ, Willemze R, Kluin PM. Activation of the c-myc oncogene in a precursor-B-cell blast crisis of follicular lymphoma, presenting as composite lymphoma. *N Engl J Med.* 1988 May 26;318(21):1373-8.
23. Yano T, Jaffe ES, Longo DL, Raffeld M. MYC rearrangements in histologically progressed follicular lymphomas. *Blood.* 1992 Aug 1;80(3):758-67.
24. Clodi K, Younes A, Goodacre A, Roberts M, Palmer J, Younes M, et al. Analysis of p53 gene deletions in patients with non-Hodgkin's lymphoma by dual-colour fluorescence in-situ hybridization. *Br J Haematol.* 1997 Sep;98(4):913-21.
25. Galteland E, Holte H, Stokke T. c-MYC, RB-1, TP53, and centromere 8 and 17 copy number in B-cell non-Hodgkin's lymphomas assessed by dual-color fluorescence in situ hybridization. *Cytometry.* 1999 Apr 15;38(2):53-60.
26. Koduru PR, Raju K, Vadmal V, Menezes G, Shah S, Susin M, et al. Correlation between mutation in P53, p53 expression, cytogenetics, histologic type, and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 1997 Nov 15;90(10):4078-91.
27. Ichikawa A, Kinoshita T, Watanabe T, Kato H, Nagai H, Tsushita K, et al. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 1997 Aug 21;337(8):529-34.
28. Young KH, Leroy K, Moller MB, Colleoni GW, Sanchez-Beato M, Kerbauy FR, et al. Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study. *Blood.* 2008 Oct 15;112(8):3088-98.
29. Young KH, Weisenburger DD, Dave BJ, Smith L, Sanger W, Iqbal J, et al. Mutations in the DNA-binding codons of TP53, which are associated with decreased expression of TRAILreceptor-2, predict for poor survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2007 Dec 15;110(13):4396-405.
30. Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med.* 1987 Nov 5;317(19):1185-9.
31. Jacobson JO, Wilkes BM, Kwaiatkowski DJ, Medeiros LJ, Aisenberg AC, Harris NL. bcl-2 rearrangements in de novo diffuse large cell lymphoma. Association with distinctive clinical features. *Cancer.* 1993 Jul 1;72(1):231-6.
32. Jerkeman M, Anderson H, Dictor M, Kvaloy S, Akerman M, Cavallin-Stahl E. Assessment of biological prognostic factors provides clinically relevant information in patients with diffuse large B-cell lymphoma--a Nordic Lymphoma Group study. *Ann Hematol.* 2004 Jul;83(7):414-9.
33. Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K, Parsa NZ, Cigudosa JC, Louie DC, et al. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 1998 Jul 1;92(1):234-40.



34. Bhagavathi S, Micale MA, Les K, Wilson JD, Wiggins ML, Fu K. Primary bone diffuse large B-cell lymphoma: clinicopathologic study of 21 cases and review of literature. *Am J Surg Pathol*. 2009 Oct;33(10):1463-9.
35. Borovecki A, Korac P, Nola M, Ivankovic D, Jaksic B, Dominis M. Prognostic significance of B-cell differentiation genes encoding proteins in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma grade 3. *Croat Med J*. 2008 Oct;49(5):625-35.
36. Durnick DK, Law ME, Maurer MJ, Natkunam Y, Levy R, Lossos IS, et al. Expression of LMO2 is associated with t(14;18)/IGH-BCL2 fusion but not BCL6 translocations in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2010 Aug;134(2):278-81.
37. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, et al. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006 Feb 20;24(6):961-8.
38. Maartense E, Kramer MH, le Cessie S, Kluin-Nelemans JC, Kluin PM, Snijder S, et al. Lack of prognostic significance of BCL2 and p53 protein overexpression in elderly patients with diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results from a population-based non-Hodgkin's lymphoma registry. *Leuk Lymphoma*. 2004 Jan;45(1):101-7.
39. Kramer MH, Hermans J, Parker J, Krol AD, Kluin-Nelemans JC, Haak HL, et al. Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol*. 1996 Jul;14(7):2131-8.
40. Jovanovic MP, Jakovic L, Bogdanovic A, Markovic O, Martinovic VC, Mihaljevic B. Poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma is associated with high percentage of bcl-2 and Ki 67-positive tumor cells. *Vojnosanit Pregl*. 2009 Sep;66(9):738-43.
41. Obermann EC, Csato M, Dirnhofer S, Tzankov A. BCL2 gene aberration as an IPI-independent marker for poor outcome in non-germinal-centre diffuse large B cell lymphoma. *J Clin Pathol*. 2009 Oct;62(10):903-7.
42. Vitolo U, Gaidano G, Botto B, Volpe G, Audisio E, Bertini M, et al. Rearrangements of bcl-6, bcl-2, c-myc and 6q deletion in B-diffuse large-cell lymphoma: clinical relevance in 71 patients. *Ann Oncol*. 1998 Jan;9(1):55-61.
43. Martinka M, Comeau T, Foyle A, Anderson D, Greer W. Prognostic significance of t(14;18) and bcl-2 gene expression in follicular small cleaved cell lymphoma and diffuse large cell lymphoma. *Clin Invest Med*. 1997 Dec;20(6):364-70.
44. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, van Krieken JH, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 1998 Nov 1;92(9):3152-62.
45. Lo Coco F, Ye BH, Lista F, Corradini P, Offit K, Knowles DM, et al. Rearrangements of the BCL6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1994 Apr 1;83(7):1757-9.
46. Offit K, Lo Coco F, Louie DC, Parsa NZ, Leung D, Portlock C, et al. Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 1994 Jul 14;331(2):74-80.
47. Volpe G, Vitolo U, Carbone A, Pastore C, Bertini M, Botto B, et al. Molecular heterogeneity of B-lineage diffuse large cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1996 May;16(1):21-30.
48. Offit K, Louie DC, Parsa NZ, Roy P, Leung D, Lo Coco F, et al. BCL6 gene rearrangement and other cytogenetic abnormalities in diffuse large cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 1995 Dec;20(1-2):85-9.
49. Chen PM, Yang MH, Yu IT, Lin JT, Lin YC, Fan FS, et al. Low incidence of BCL-6 gene alterations for diffuse large B-cell lymphomas in Taiwan Chinese. *Cancer*. 2002 May 15;94(10):2635-44.
50. Lossos IS, Jacobs Y, Cleary ML, Levy R. Re: Akasaka, H., et al., Molecular anatomy of BCL6 translocations revealed by long-distance polymerase chain reaction-based assays. *Cancer Res*. 60: 2335-2341, 2000. *Cancer Res*. 2001 Oct 1;61(19):7363-4.





51. Dent AL, Vasanwala FH, Toney LM. Regulation of gene expression by the proto-oncogene BCL-6. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002 Jan;41(1):1-9.
52. Artiga MJ, Saez AI, Romero C, Sanchez-Beato M, Mateo MS, Navas C, et al. A short mutational hot spot in the first intron of BCL-6 is associated with increased BCL-6 expression and with longer overall survival in large B-cell lymphomas. *Am J Pathol*. 2002 Apr;160(4):1371-80.
53. Capello D, Vitolo U, Pasqualucci L, Quattrone S, Migliaretti G, Fassone L, et al. Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia. *Blood*. 2000 Jan 15;95(2):651-9.
54. Lossos IS, Levy R. Mutation analysis of the 5' noncoding regulatory region of the BCL-6 gene in non-Hodgkin lymphoma: evidence for recurrent mutations and intracлонаl heterogeneity. *Blood*. 2000 Feb 15;95(4):1400-5.
55. Migliazza A, Martinotti S, Chen W, Fusco C, Ye BH, Knowles DM, et al. Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 19;92(26):12520-4.
56. Jerkeman M, Aman P, Cavallin-Stahl E, Torlakovic E, Akerman M, Mitelman F, et al. Prognostic implications of BCL6 rearrangement in uniformly treated patients with diffuse large B-cell lymphoma--a Nordic Lymphoma Group study. *Int J Oncol*. 2002 Jan;20(1):161-5.
57. Chen W, Iida S, Louie DC, Dalla-Favera R, Chaganti RS. Heterologous promoters fused to BCL6 by chromosomal translocations affecting band 3q27 cause its deregulated expression during B-cell differentiation. *Blood*. 1998 Jan 15;91(2):603-7.
58. Akasaka H, Akasaka T, Kurata M, Ueda C, Shimizu A, Uchiyama T, et al. Molecular anatomy of BCL6 translocations revealed by long-distance polymerase chain reaction-based assays. *Cancer Res*. 2000 May 1;60(9):2335-41.
59. Akasaka T, Ueda C, Kurata M, Akasaka H, Yamabe H, Uchiyama T, et al. Nonimmunoglobulin (non-Ig)/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma results in worse prognosis than Ig/BCL6. *Blood*. 2000 Oct 15;96(8):2907-9.
60. Antillon F, Behm FG, Raimondi SC, Kaste SC, Sandlund JT, Pappo AS. Pediatric primary diffuse large cell lymphoma of bone with t(3;22)(q27;q11). *J Pediatr Hematol Oncol*. 1998 Nov-Dec;20(6):552-5.
61. Chang CC, Kampalath B, Schultz C, Bunyi-Teopengco E, Logan B, Esho C, et al. Expression of p53, c-Myc, or Bcl-6 suggests a poor prognosis in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma among immunocompetent individuals. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Feb;127(2):208-12.
62. Ichinohasama R, Miura I, Shishido T, Matsumoto K, Shimizu Y, Miki T, et al. Translocation (3;16)(q27;p11) in a patient with diffuse large B-cell lymphoma associated with the BCL-6 gene rearrangement. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998 Jun;103(2):133-9.
63. Ye H, Gesk S, Martin-Subero JJ, Nader A, Du MQ, Siebert R. BCL10 gene amplification associated with strong nuclear BCL10 expression in a diffuse large B cell lymphoma with IGH-BCL2 fusion. *Haematologica*. 2006 Jun;91(6 Suppl):ECR28.
64. Ohshima K, Kawasaki C, Muta H, Muta K, Deyev V, Haraoka S, et al. CD10 and Bcl10 expression in diffuse large B-cell lymphoma: CD10 is a marker of improved prognosis. *Histopathology*. 2001 Aug;39(2):156-62.
65. Sakai R, Kanamori H, Ishigatsubo Y. [Long-term remission after CHOP therapy in a case of multifocal extranodal diffuse large B-cell lymphoma with t(1 ; 14) (p22 ; q32) and rearrangement of bcl-10]. *Rinsho Ketsueki*. 2005 Oct;46(10):1105-8.
66. Kawasaki C, Ohshima K, Muta H, Muta K, Deyev V, Podack ER, et al. Prognostic value of Bcl 10 rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2002 Apr;43(4):823-6.
67. Staudt LM, Dave S. The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol*. 2005;87:163-208.



68. Savage KJ, Monti S, Kutok JL, Cattoretti G, Neuberger D, De Leval L, et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003 Dec 1;102(12):3871-9.
69. Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. New perspectives in B-1 B cell development and function. *Trends Immunol*. 2006 Sep;27(9):428-33.
70. Loder F, Mutschler B, Ray RJ, Paige CJ, Sideras P, Torres R, et al. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med*. 1999 Jul 5;190(1):75-89.
71. Fu SM, Winchester RJ, Feizi T, Walzer PD, Kunkel HG. Idiotypic specificity of surface immunoglobulin and the maturation of leukemic bone-marrow-derived lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974 Nov;71(11):4487-90.
72. Cariappa A, Pillai S. Antigen-dependent B-cell development. *Curr Opin Immunol*. 2002 Apr;14(2):241-9.
73. Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol*. 2002 May;2(5):323-35.
74. Balazs M, Martin F, Zhou T, Kearney J. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity*. 2002 Sep;17(3):341-52.
75. Miller MJ, Wei SH, Parker I, Cahalan MD. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science*. 2002 Jun 7;296(5574):1869-73.
76. Kantor AB. The development and repertoire of B-1 cells (CD5 B cells). *Immunol Today*. 1991 Nov;12(11):389-91.
77. Timens W, Boes A, Poppema S. Human marginal zone B cells are not an activated B cell subset: strong expression of CD21 as a putative mediator for rapid B cell activation. *Eur J Immunol*. 1989 Nov;19(11):2163-6.
78. Roux KH. Immunoglobulin structure and function as revealed by electron microscopy. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999 Oct;120(2):85-99.
79. Underdown BJ, Schiff JM. Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu Rev Immunol*. 1986;4:389-417.
80. Gould HJ, Sutton BJ, Beavil AJ, Beavil RL, McCloskey N, Coker HA, et al. The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:579-628.
81. Woof JM, Burton DR. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat Rev Immunol*. 2004 Feb;4(2):89-99.
82. Knight JC, Keating BJ, Kwiatkowski DP. Allele-specific repression of lymphotoxin-alpha by activated B cell factor-1. *Nat Genet*. 2004 Apr;36(4):394-9.
83. Nemazee D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct;6(10):728-40.
84. Market E, Papavasiliou FN. V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system. *PLoS Biol*. 2003 Oct;1(1):E16.
85. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*. 1992 Mar 6;68(5):869-77.
86. Nussenzweig MC, Alt FW. Antibody diversity: one enzyme to rule them all. *Nat Med*. 2004 Dec;10(12):1304-5.
87. Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, Alt FW. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:541-70.
88. Bassing CH, Swat W, Alt FW. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell*. 2002 Apr;109 Suppl:S45-55.
89. McBlane JF, van Gent DC, Ramsden DA, Romeo C, Cuomo CA, Gellert M, et al. Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell*. 1995 Nov 3;83(3):387-95.



90. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*. 1992 Mar 6;68(5):855-67.
91. Fugmann SD, Lee AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:495-527.
92. Meier JT, Lewis SM. P nucleotides in V(D)J recombination: a fine-structure analysis. *Mol Cell Biol*. 1993 Feb;13(2):1078-92.
93. Aguilera RJ, Akira S, Okazaki K, Sakano H. A pre-B cell nuclear protein that specifically interacts with the immunoglobulin V-J recombination sequences. *Cell*. 1987 Dec 24;51(6):909-17.
94. Feeney AJ, Tang A, Ogwaro KM. B-cell repertoire formation: role of the recombination signal sequence in non-random V segment utilization. *Immunol Rev*. 2000 Jun;175:59-69.
95. Sawchuk DJ, Weis-Garcia F, Malik S, Besmer E, Bustin M, Nussenzweig MC, et al. V(D)J recombination: modulation of RAG1 and RAG2 cleavage activity on 12/23 substrates by whole cell extract and DNA-bending proteins. *J Exp Med*. 1997 Jun 2;185(11):2025-32.
96. Bassing CH, Alt FW, Hughes MM, D'Auteuil M, Wehrly TD, Woodman BB, et al. Recombination signal sequences restrict chromosomal V(D)J recombination beyond the 12/23 rule. *Nature*. 2000 Jun 1;405(6786):583-6.
97. Drejer-Teel AH, Fugmann SD, Schatz DG. The beyond 12/23 restriction is imposed at the nicking and pairing steps of DNA cleavage during V(D)J recombination. *Mol Cell Biol*. 2007 Sep;27(18):6288-99.
98. Nishihara T, Nagawa F, Imai T, Sakano H. RAG-heptamer interaction in the synaptic complex is a crucial biochemical checkpoint for the 12/23 recombination rule. *J Biol Chem*. 2008 Feb 22;283(8):4877-85.
99. Steen SB, Gomelsky L, Roth DB. The 12/23 rule is enforced at the cleavage step of V(D)J recombination in vivo. *Genes Cells*. 1996 Jun;1(6):543-53.
100. Swanson PC. A RAG-1/RAG-2 tetramer supports 12/23-regulated synapsis, cleavage, and transposition of V(D)J recombination signals. *Mol Cell Biol*. 2002 Nov;22(22):7790-801.
101. Adachi N, Kurosawa A, Koyama H. Highly proficient gene targeting by homologous recombination in the human pre-B cell line Nalm-6. *Methods Mol Biol*. 2008;435:17-29.
102. Gao Y, Chaudhuri J, Zhu C, Davidson L, Weaver DT, Alt FW. A targeted DNA-PKcs-null mutation reveals DNA-PK-independent functions for KU in V(D)J recombination. *Immunity*. 1998 Sep;9(3):367-76.
103. Mizuta R, Taccioli GE, Alt FW. The V(D)J recombination defect in the xrs-6 cell line results from a point mutation in the Ku80 gene. *Int Immunol*. 1996 Sep;8(9):1467-71.
104. Zheng X, Schwarz K. Making V(D)J rearrangement visible: quantification of recombination efficiency in real time at the single cell level. *J Immunol Methods*. 2006 Aug 31;315(1-2):133-43.
105. Jiang H, Ross AE, Desiderio S. Cell cycle-dependent accumulation in vivo of transposition-competent complexes between recombination signal ends and full-length RAG proteins. *J Biol Chem*. 2004 Feb 27;279(9):8478-86.
106. Gao Y, Sun Y, Frank KM, Dikkes P, Fujiwara Y, Seidl KJ, et al. A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell*. 1998 Dec 23;95(7):891-902.
107. Nadel B, Feeney AJ. Nucleotide deletion and P addition in V(D)J recombination: a determinant role of the coding-end sequence. *Mol Cell Biol*. 1997 Jul;17(7):3768-78.
108. Nadel B, Feeney AJ. Influence of coding-end sequence on coding-end processing in V(D)J recombination. *J Immunol*. 1995 Nov 1;155(9):4322-9.
109. Bergman Y, Cedar H. A stepwise epigenetic process controls immunoglobulin allelic exclusion. *Nat Rev Immunol*. 2004 Oct;4(10):753-61.



110. Diaz M, Casali P. Somatic immunoglobulin hypermutation. *Curr Opin Immunol*. 2002 Apr;14(2):235-40.
111. Inui S, Maeda K, Hua DR, Yamashita T, Yamamoto H, Miyamoto E, et al. BCR signal through alpha 4 is involved in S6 kinase activation and required for B cell maturation including isotype switching and V region somatic hypermutation. *Int Immunol*. 2002 Feb;14(2):177-87.
112. Honjo T, Habu S. Origin of immune diversity: genetic variation and selection. *Annu Rev Biochem*. 1985;54:803-30.
113. Or-Guil M, Wittenbrink N, Weiser AA, Schuchhardt J. Recirculation of germinal center B cells: a multilevel selection strategy for antibody maturation. *Immunol Rev*. 2007 Apr;216:130-41.
114. Neuberger MS, Ehrenstein MR, Rada C, Sale J, Batista FD, Williams G, et al. Memory in the B-cell compartment: antibody affinity maturation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2000 Mar 29;355(1395):357-60.
115. Stavnezer J, Amemiya CT. Evolution of isotype switching. *Semin Immunol*. 2004 Aug;16(4):257-75.
116. Durandy A. Activation-induced cytidine deaminase: a dual role in class-switch recombination and somatic hypermutation. *Eur J Immunol*. 2003 Aug;33(8):2069-73.
117. Casali P, Zan H. Class switching and Myc translocation: how does DNA break? *Nat Immunol*. 2004 Nov;5(11):1101-3.
118. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Sep;4(9):712-20.
119. Kotnis A, Du L, Liu C, Popov SW, Pan-Hammarstrom Q. Non-homologous end joining in class switch recombination: the beginning of the end. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009 Mar 12;364(1517):653-65.
120. Rooney S, Chaudhuri J, Alt FW. The role of the non-homologous end-joining pathway in lymphocyte development. *Immunol Rev*. 2004 Aug;200:115-31.
121. Chaudhuri J, Alt FW. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jul;4(7):541-52.
122. Chaudhuri J, Basu U, Zarrin A, Yan C, Franco S, Perlot T, et al. Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv Immunol*. 2007;94:157-214.
123. Lieber MR. The biochemistry and biological significance of nonhomologous DNA end joining: an essential repair process in multicellular eukaryotes. *Genes Cells*. 1999 Feb;4(2):77-85.
124. Lieber MR. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem*. 2008 Jan 4;283(1):1-5.
125. Lieber MR, Yu K, Raghavan SC. Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations. *DNA Repair (Amst)*. 2006 Sep 8;5(9-10):1234-45.
126. Fanning LJ, Connor AM, Wu GE. Development of the immunoglobulin repertoire. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996 Apr;79(1):1-14.
127. Ehrlich P. Die Seitenkettentheorie und ihre Gegner. *Muenchener medizinische Wochenschrift*. 1901:2123-4.
128. Landsteiner K. Bur Kennie red argumentiveness, Fleischer undo agglomeration. *Workings eds Blusters fund deer Nymphet. Bakteriologie, Parasitenkunde u Infektionskrankheiten*. 1900;27:357-62.
129. Burnet FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Aust J Sci*. 1957;20:67-9.
130. Burnet FM. Clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge: Cambridge University Press; 1959.



131. Wu TT, Kabat EA. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med.* 1970 Aug 1;132(2):211-50.
132. Sharkey DJ, Scalice ER, Christy KG, Jr., Atwood SM, Daiss JL. Antibodies as thermolabile switches: high temperature triggering for the polymerase chain reaction. *Biotechnology (N Y).* 1994 May;12(5):506-9.
133. Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res.* 1992 Apr 11;20(7):1717-23.
134. Takagi M, Nishioka M, Kakihara H, Kitabayashi M, Inoue H, Kawakami B, et al. Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Nov;63(11):4504-10.
135. Nishioka M, Mizuguchi H, Fujiwara S, Komatsubara S, Kitabayashi M, Uemura H, et al. Long and accurate PCR with a mixture of KOD DNA polymerase and its exonuclease deficient mutant enzyme. *J Biotechnol.* 2001 Jun 15;88(2):141-9.
136. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Dec;85(24):9436-40.
137. Meier VS, Ruffle A, Gudat F. Simultaneous evaluation of T- and B-cell clonality, t(11;14) and t(14;18), in a single reaction by a four-color multiplex polymerase chain reaction assay and automated high-resolution fragment analysis: a method for the rapid molecular diagnosis of lymphoproliferative disorders applicable to fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, blood, and bone marrow aspirates. *Am J Pathol.* 2001 Dec;159(6):2031-43.
138. Mishima K, Matsuoka H, Yamada E, Yoshikawa T, Shiotani H, Takayama K, et al. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of malignant lymphoma of the nasal and oral cavities. *J Oral Pathol Med.* 1998 Jan;27(1):43-7.
139. Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol.* 1991 Feb;95(2):117-24.
140. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.
141. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Comput Appl Biosci.* 1994 Apr;10(2):189-91.
142. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987 Jul;4(4):406-25.
143. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics.* 2001 Dec;17(12):1244-5.
144. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 2004 Jun;5(2):150-63.
145. Higgins DG, Thompson JD, Gibson TJ. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol.* 1996;266:383-402.
146. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007 Aug;24(8):1596-9.
147. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5;215(3):403-10.
148. Mies C. Molecular biological analysis of paraffin-embedded tissues. *Hum Pathol.* 1994 Jun;25(6):555-60.
149. Shibata D. Extraction of DNA from paraffin-embedded tissue for analysis by polymerase chain reaction: new tricks from an old friend. *Hum Pathol.* 1994 Jun;25(6):561-3.



150. Greer CE, Lund JK, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods Appl.* 1991 Aug;1(1):46-50.
151. Impraim CC, Saiki RK, Erlich HA, Teplitz RL. Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987 Feb 13;142(3):710-6.
152. Hewett PJ, Fargira F, Morley A. The influence of age of template DNA derived from archival tissue on the outcome of the polymerase chain reaction. *Aust N Z J Surg.* 1994 Aug;64(8):558-9.
153. Neubauer A, Neubauer B, He M, Effert P, Iglehart D, Frye RA, et al. Analysis of gene amplification in archival tissue by differential polymerase chain reaction. *Oncogene.* 1992 May;7(5):1019-25.
154. Lampertico P, Malter JS, Colombo M, Gerber MA. Detection of hepatitis B virus DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded liver tissue by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol.* 1990 Aug;137(2):253-8.
155. Silverman GJ, Lucas AH. Variable region diversity in human circulating antibodies specific for the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. Preferential usage of two types of VH3 heavy chains. *J Clin Invest.* 1991 Sep;88(3):911-20.
156. Adderson EE, Shackelford PG, Quinn A, Wilson PM, Cunningham MW, Insel RA, et al. Restricted immunoglobulin VH usage and VDJ combinations in the human response to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. Nucleotide sequences of monospecific anti-*Haemophilus* antibodies and polyspecific antibodies cross-reacting with self antigens. *J Clin Invest.* 1993 Jun;91(6):2734-43.
157. Silberstein LE, Jefferies LC, Goldman J, Friedman D, Moore JS, Nowell PC, et al. Variable region gene analysis of pathologic human autoantibodies to the related i and I red blood cell antigens. *Blood.* 1991 Nov 1;78(9):2372-86.
158. Isenberg D, Spellerberg M, Williams W, Griffiths M, Stevenson F. Identification of the 9G4 idiotope in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol.* 1993 Oct;32(10):876-82.
159. Stevenson FK, Longhurst C, Chapman CJ, Ehrenstein M, Spellerberg MB, Hamblin TJ, et al. Utilization of the VH4-21 gene segment by anti-DNA antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 1993 Dec;6(6):809-25.
160. Brezinschek HP, Brezinschek RI, Lipsky PE. Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *J Immunol.* 1995 Jul 1;155(1):190-202.
161. Stewart AK, Huang C, Stollar BD, Schwartz RS. High-frequency representation of a single VH gene in the expressed human B cell repertoire. *J Exp Med.* 1993 Apr 1;177(4):1227.
162. Stevenson FK, Smith GJ, North J, Hamblin TJ, Glennie MJ. Identification of normal B-cell counterparts of neoplastic cells which secrete cold agglutinins of anti-I and anti-i specificity. *Br J Haematol.* 1989 May;72(1):9-15.
163. Pascual V, Capra JD. Human immunoglobulin heavy-chain variable region genes: organization, polymorphism, and expression. *Adv Immunol.* 1991;49:1-74.
164. Yamada M, Wasserman R, Reichard BA, Shane S, Caton AJ, Rovera G. Preferential utilization of specific immunoglobulin heavy chain diversity and joining segments in adult human peripheral blood B lymphocytes. *J Exp Med.* 1991 Feb 1;173(2):395-407.
165. Kraj P, Rao SP, Glas AM, Hardy RR, Milner EC, Silberstein LE. The human heavy chain Ig V region gene repertoire is biased at all stages of B cell ontogeny, including early pre-B cells. *J Immunol.* 1997 Jun 15;158(12):5824-32.
166. Mackworth-Young CG, Harmer IJ, Mageed RA. The role of antigen in the selection of the human V3-23 immunoglobulin heavy chain variable region gene. *Clin Exp Immunol.* 2003 Dec;134(3):420-5.



167. Harmer IJ, Mageed RA, Kaminski A, Charles P, Bruggemann M, Mackworth-Young CG. Chimaeric monoclonal antibodies encoded by the human VH26 gene from naive transgenic mice display a wide range of antigen-binding specificities. *Immunology*. 1996 Jun;88(2):174-82.
168. Mageed RA, Harmer IJ, Wynn SL, Moyes SP, Maziak BB, Bruggemann M, et al. Rearrangement of the human heavy chain variable region gene V3-23 in transgenic mice generates antibodies reactive with a range of antigens on the basis of VHCDR3 and residues intrinsic to the heavy chain variable region. *Clin Exp Immunol*. 2001 Jan;123(1):1-8.
169. Yu K, Taghva A, Lieber MR. The cleavage efficiency of the human immunoglobulin heavy chain VH elements by the RAG complex: implications for the immune repertoire. *J Biol Chem*. 2002 Feb 15;277(7):5040-6.
170. Davis MM, Lyons DS, Altman JD, McHeyzer-Williams M, Hampl J, Boniface JJ, et al. T cell receptor biochemistry, repertoire selection and general features of TCR and Ig structure. *Ciba Found Symp*. 1997;204:94-100; discussion -4.
171. Hesse JE, Lieber MR, Mizuuchi K, Gellert M. V(D)J recombination: a functional definition of the joining signals. *Genes Dev*. 1989 Jul;3(7):1053-61.
172. Akira S, Okazaki K, Sakano H. Two pairs of recombination signals are sufficient to cause immunoglobulin V-(D)-J joining. *Science*. 1987 Nov 20;238(4830):1134-8.
173. Jeong HD, Komisar JL, Kraig E, Teale JM. Strain-dependent expression of VH gene families. *J Immunol*. 1988 Apr 1;140(7):2436-41.
174. Jeong HD, Teale JM. Comparison of the fetal and adult functional B cell repertoires by analysis of VH gene family expression. *J Exp Med*. 1988 Aug 1;168(2):589-603.
175. Wu GE, Atkinson MJ, Ramsden DA, Paige CJ. VH gene repertoire. *Semin Immunol*. 1990 May;2(3):207-16.
176. Williams GS, Martinez A, Montalbano A, Tang A, Mauhar A, Ogwaro KM, et al. Unequal VH gene rearrangement frequency within the large VH7183 gene family is not due to recombination signal sequence variation, and mapping of the genes shows a bias of rearrangement based on chromosomal location. *J Immunol*. 2001 Jul 1;167(1):257-63.
177. Lossos IS, Okada CY, Tibshirani R, Warnke R, Vose JM, Greiner TC, et al. Molecular analysis of immunoglobulin genes in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2000 Mar 1;95(5):1797-803.
178. Daley MD, Berinstein NL, Siminovitch KA. Immunoglobulin heavy chain variable gene utilization in human large cell and Burkitt's lymphoma cell lines. *Clin Invest Med*. 1994 Dec;17(6):522-30.
179. Kuppers R, Rajewsky K, Hansmann ML. Diffuse large cell lymphomas are derived from mature B cells carrying V region genes with a high load of somatic mutation and evidence of selection for antibody expression. *Eur J Immunol*. 1997 Jun;27(6):1398-405.
180. Rosenquist R, Lindstrom A, Holmberg D, Lindh J, Roos G. V(H) gene family utilization in different B-cell lymphoma subgroups. *Eur J Haematol*. 1999 Feb;62(2):123-8.
181. Nakamura N, Kuze T, Hashimoto Y, Hara Y, Hoshi S, Sasaki Y, et al. Analysis of the immunoglobulin heavy chain gene variable region of CD5-positive and -negative diffuse large B cell lymphoma. *Leukemia*. 2001 Mar;15(3):452-7.
182. Hsu FJ, Levy R. Preferential use of the VH4 Ig gene family by diffuse large-cell lymphoma. *Blood*. 1995 Oct 15;86(8):3072-82.
183. Funkhouser WK, Warnke RA. Preferential IgH V4-34 gene segment usage in particular subtypes of B-cell lymphoma detected by antibody 9G4. *Hum Pathol*. 1998 Nov;29(11):1317-21.
184. Stevenson FK, Spellerberg MB, Treasure J, Chapman CJ, Silberstein LE, Hamblin TJ, et al. Differential usage of an Ig heavy chain variable region gene by human B-cell tumors. *Blood*. 1993 Jul 1;82(1):224-30.



185. Walsh SH, Thorselius M, Johnson A, Soderberg O, Jerkeman M, Bjorck E, et al. Mutated VH genes and preferential VH3-21 use define new subsets of mantle cell lymphoma. *Blood*. 2003 May 15;101(10):4047-54.
186. Camacho FI, Algara P, Rodriguez A, Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Martinez N, et al. Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. *Blood*. 2003 May 15;101(10):4042-6.
187. Kipps TJ, Tomhave E, Pratt LF, Duffy S, Chen PP, Carson DA. Developmentally restricted immunoglobulin heavy chain variable region gene expressed at high frequency in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989 Aug;86(15):5913-7.
188. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest*. 1998 Oct 15;102(8):1515-25.
189. Riboldi P, Gaidano G, Schettino EW, Steger TG, Knowles DM, Dalla-Favera R, et al. Two acquired immunodeficiency syndrome-associated Burkitt's lymphomas produce specific anti-IgM cold agglutinins using somatically mutated VH4-21 segments. *Blood*. 1994 May 15;83(10):2952-61.
190. Sorrentino D, Ferraccioli GF, DeVita S, Avellini C, Beltrami CA, Labombarda A, et al. B-cell clonality and infection with *Helicobacter pylori*: implications for development of gastric lymphoma. *Gut*. 1996 Jun;38(6):837-40.
191. Torlakovic E, Cherwitz DL, Jessurun J, Scholes J, McGlennen R. B-cell gene rearrangement in benign and malignant lymphoid proliferations of mucosa-associated lymphoid tissue and lymph nodes. *Hum Pathol*. 1997 Feb;28(2):166-73.
192. Takano Y, Kato Y, Sato Y, Okudaira M. Clonal Ig-gene rearrangement in some cases of gastric RLH detected by PCR method. *Pathol Res Pract*. 1992 Dec;188(8):973-80.
193. Algara P, Martinez P, Sanchez L, Villuendas R, Benitez J, Rivas C, et al. The detection of B-cell monoclonal populations by polymerase chain reaction: accuracy of approach and application in gastric endoscopic biopsy specimens. *Hum Pathol*. 1993 Nov;24(11):1184-8.
194. Berget E, Helgeland L, Molven A, Vintermyr OK. Detection of clonality in follicular lymphoma using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples and BIOMED-2 immunoglobulin primers. *J Clin Pathol*. 2010 Oct 28.
195. Derksen PW, Langerak AW, Kerkhof E, Wolvers-Tettero IL, Boor PP, Mulder AH, et al. Comparison of different polymerase chain reaction-based approaches for clonality assessment of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements in B-cell neoplasia. *Mod Pathol*. 1999 Aug;12(8):794-805.
196. Halldorsdottir AM, Zehnbaauer BA, Burack WR. Application of BIOMED-2 clonality assays to formalin-fixed paraffin embedded follicular lymphoma specimens: superior performance of the IGK assays compared to IGH for suboptimal specimens. *Leuk Lymphoma*. 2007 Jul;48(7):1338-43.
197. Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rudiger T, Wilhelm M, et al. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3806-12.
198. Mirza I, Macpherson N, Paproski S, Gascoyne RD, Yang B, Finn WG, et al. Primary cutaneous follicular lymphoma: an assessment of clinical, histopathologic, immunophenotypic, and molecular features. *J Clin Oncol*. 2002 Feb 1;20(3):647-55.
199. Ngan B, Warnke A, O'Leary ML. Variability of immunoglobulin expression in follicular lymphoma. An immunohistologic and molecular genetic study. *Am J Pathol*. 1989 Dec;135(6):1139-44.





200. Noppe SM, Heirman C, Bakkus MH, Brissinck J, Schots R, Thielemans K. The genetic variability of the VH genes in follicular lymphoma: the impact of the hypermutation mechanism. *Br J Haematol.* 1999 Dec;107(3):625-40.
201. Yanez R, Barrios Y, Cabrera R, Diaz-Espada F. Intraclonal variability of VH genes in follicular lymphoma patients who have received anti-idiotypic immunotherapy. *J Immunother.* 2006 Jan-Feb;29(1):61-6.
202. Ishihara S, Okada S, Wakiguchi H, Kurashige T, Hirai K, Kawa-Ha K. Clonal lymphoproliferation following chronic active Epstein-Barr virus infection and hypersensitivity to mosquito bites. *Am J Hematol.* 1997 Apr;54(4):276-81.
203. Park S, Bahng S, Kim EK, Park SB, Sung YK, Kim SJ, et al. Hodgkin's lymphoma arising in a patient with hypersensitivity to mosquito bites: a case report. *J Clin Oncol.* 2010 Apr 1;28(10):e148-50.

## II. ΒΙΒΛΙΑ

1. Μαλάμου-Μήτση Β, Μπάη Μ, Στεφάνου Δ, Μπατιστάτου Α, Γούσια Α. Γενική Παθολογική Ανατομική. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2010.
2. Μαλάμου-Μήτση Β, Μπάη Μ, Στεφάνου Δ, Μπατιστάτου Α, Γούσια Α. Ειδική Παθολογική Ανατομική II. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2010.
3. Roitt I, Brostoff J, Male D. Ανοσολογία, 5<sup>η</sup> έκδοση. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε., 2000.
4. Stryer L. Βιοχημεία: Τόμος 2<sup>ος</sup>, 2<sup>η</sup> έκδοση. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1997.
5. Lewin B. Genes VIII. International Edition, Pearson Prentice Hall, 2004.
6. Janeway CA, Travers P. Κλινική Ανοσοβιολογία, 2<sup>η</sup> έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 1999.

